

Aus dem Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg

Leiter: Reg. Vet. Direktor Priv.-Doz. Dr. J. NASSAL

und aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. H. Bartels

**Untersuchungen zum Hemmstoffnachweis in  
Fleischproben mit *Bac. stearothersophilus* var.  
*calidolactis* C 953 und *Bac. subtilis* BGA**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
JÜRGEN DIETER FLECK  
Tierarzt aus Frankfurt/Main

Gießen 1973



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41545914\\_0031](https://archive.org/details/IA41545914_0031)

Aus dem Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg

Leiter: Reg. Vet. Direktor Priv.-Doz. Dr. J. NASSAL

und aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. H. Bartels

**Untersuchungen zum Hemmstoffnachweis in  
Fleischproben mit *Bac. stearothermophilus* var.  
*calidolactis* C 953 und *Bac. subtilis* BGA**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

bei dem Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

JÜRGEN DIETER FLECK

Tierarzt aus Frankfurt/Main

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
in Gießen

---

Dekan: Prof. Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Priv.Doiz. Dr. J. Nassal

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1973



## Einleitung

### 1. Zielsetzung

### 2. Begriffsdefinition

#### 2.1. Begriffsdefinition

1. Begriffsdefinition und Zielsetzung

2. Begriffsdefinition und Zielsetzung

3. Begriffsdefinition und Zielsetzung

4. Begriffsdefinition und Zielsetzung

#### 2.2. Begriffsdefinition und Zielsetzung

1. Begriffsdefinition und Zielsetzung

2. Begriffsdefinition und Zielsetzung

3. Begriffsdefinition und Zielsetzung

4. Begriffsdefinition und Zielsetzung

5. Begriffsdefinition und Zielsetzung

6. Begriffsdefinition und Zielsetzung

7. Begriffsdefinition und Zielsetzung

8. Begriffsdefinition und Zielsetzung

9. Begriffsdefinition und Zielsetzung

10. Begriffsdefinition und Zielsetzung

11. Begriffsdefinition und Zielsetzung

12. Begriffsdefinition und Zielsetzung

13. Begriffsdefinition und Zielsetzung

14. Begriffsdefinition und Zielsetzung

### 3. Hauptteil

#### 3.1. Hauptteil

1. Hauptteil und Zielsetzung

2. Hauptteil und Zielsetzung

3. Hauptteil und Zielsetzung

4. Hauptteil und Zielsetzung

5. Hauptteil und Zielsetzung

6. Hauptteil und Zielsetzung

7. Hauptteil und Zielsetzung

8. Hauptteil und Zielsetzung



## Inhaltsverzeichnis

Seite

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. <u>Einleitung</u>                                                                         | 1  |
| B. <u>Schrifttum</u>                                                                         | 2  |
| I. Hemmstoffe                                                                                | 2  |
| 1. Antibiotika und Chemotherapeutika                                                         | 2  |
| 2. Konservierungs- und Desinfektionsmittel                                                   | 10 |
| 3. Natürliche Hemmstoffe                                                                     | 10 |
| 4. Hemmstoffe unbekannter Natur                                                              | 11 |
| II. Hemmstoffnachweisverfahren                                                               | 12 |
| 1. Chemische bzw. physiko-chemische Verfahren zum Antibiotikanachweis                        | 12 |
| 2. Mikrobiologische Verfahren zum Hemmstoffnachweis                                          | 13 |
| 2.1. Mikroorganismen zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis                                 | 21 |
| 2.2. <i>Bacillus stearothermophilus</i> als Testkeim zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis | 27 |
| 2.3. Mikroorganismen zur Differenzierung von Hemmstoffen                                     | 35 |
| 3. Mikrobiologisch-chemisches Verfahren zum Antibiotikanachweis                              | 35 |
| C. <u>Eigene Untersuchungen</u>                                                              | 40 |
| I. Material                                                                                  | 40 |
| 1. a) <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953                      | 40 |
| b) <i>Bacillus subtilis</i> BGA                                                              | 40 |
| 2. Nährböden                                                                                 | 41 |
| 3. Brillantschwarzreduktions (BR)-Teströhrchen                                               | 41 |
| 4. Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern und Muskulatur                                            | 41 |

|                                                                                        | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5. Hemmstofffreie Nieren                                                               | 41    |
| 6. Hemmstofffreie Muskulatur                                                           | 42    |
| 7. Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen                                   | 42    |
| II. Methodik                                                                           | 42    |
| 1. Herstellung der Bazillen- bzw. Sporensuspensionen                                   | 42    |
| a) Bac. stearothersophilus-Suspension                                                  | 42    |
| b) Bac. subtilis-Sporensuspension                                                      | 43    |
| 2. Herstellung der Bazillen- bzw. Sporen-Agarnährböden                                 | 43    |
| a) Bac. stearothersophilus-Agarnährböden                                               | 43    |
| b) Bac. subtilis-Agarnährböden                                                         | 44    |
| 3. Vergleich von Bac. stearothersophilus var. calidolactis C 953 mit Bac. subtilis BGA | 44    |
| a) Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen                                   | 45    |
| b) Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen   | 45    |
| c) Hemmstofffreie Nieren von Rindern, Kälbern und Schweinen                            | 45    |
| d) Hemmstofffreie Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen                        | 45    |
| 4. Bac. stearothersophilus var. calidolactis C 953                                     | 45    |
| a) Haltbarkeit der Suspension                                                          | 46    |
| b) Verschiedene Agarschichtdicke des Testsystems                                       | 46    |
| c) Verschiedene Keimkonzentrationen im Agar                                            | 46    |
| d) Verschiedene pH-Werte                                                               | 46    |
| e) Vordiffusion                                                                        | 46    |
| f) Brillantschwarzreduktions (BR)-Teströhrchen                                         | 46    |

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. Auswertung                                                                                  | 47 |
| III. Ergebnisse                                                                                | 50 |
| 1. Herstellung der Bac. stearothermo-<br>philus-Suspension                                     | 50 |
| 2. Vergleich von Bac. stearothermophilus<br>var. calidolactis C 953 mit Bac. sub-<br>tilis BGA | 50 |
| a) Antibiotika- und Chemotherapeu-<br>tika-Reinsubstanzen                                      | 50 |
| b) Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern<br>und Muskulatur von Rindern, Käl-<br>bern und Schweinen   | 52 |
| c) Hemmstofffreie Nieren von Rin-<br>dern, Kälbern und Schweinen                               | 70 |
| d) Hemmstofffreie Muskulatur von<br>Rindern, Kälbern und Schweinen                             | 71 |
| 3. Bac. stearothermophilus var. calido-<br>lactis C 953                                        | 72 |
| a) Haltbarkeit der Suspension                                                                  | 72 |
| b) Verschiedene Agarschichtdicke des<br>Testsystems                                            | 72 |
| c) Verschiedene Keimkonzentrationen<br>im Agar                                                 | 74 |
| d) Verschiedene pH-Werte                                                                       | 78 |
| e) Vordiffusion                                                                                | 79 |
| f) Brillantschwarzreduktions (BR)-<br>Teströhrchen                                             | 81 |
| 4. Zusammenstellung der Ergebnisse                                                             | 84 |
| D. <u>Besprechung der Ergebnisse und Diskussion</u>                                            | 87 |
| E. <u>Zusammenfassung</u>                                                                      | 95 |
| F. <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                 | 97 |



## A Einleitung

Die Antibiotika haben der Menschheit in der Hand des Human- und Veterinärmediziners unschätzbare Dienste erwiesen. Jedoch sind auch Schädwirkungen bei unsachgemäßer und unkontrollierter Anwendung bekannt geworden. Es kann zu toxischen und allergischen Reaktionen beim Menschen kommen; außerdem zur Zunahme von antibiotika- und damit therapieresistenten Bakterien durch Resistenzbildung und Resistenzübertragung. Die Ergebnisse der Bakteriologischen Fleischuntersuchung können bei Anwesenheit von Antibiotika verschleiert sowie technologische Prozesse bei der Verarbeitung von Lebensmitteln tierischer Herkunft beeinträchtigt werden.

Gerade in jüngerer Zeit hat die unkontrollierte Anwendung von Antibiotika bei der tierischen Produktion sehr stark zugenommen. Untersuchungen von not- bzw. krankgeschlachteten Tieren anlässlich der Bakteriologischen Fleischuntersuchung beweisen dies. Untersuchungen bei Normalschlachtungen ergaben noch alarmierendere Ergebnisse.

Es ist daher notwendig, Hemmstoffuntersuchungen in die Routinediagnostik einzuführen. Dies kann aber nur mit Hilfe von arbeitstechnisch einfachen und schnell ablesbaren Untersuchungsmethoden geschehen. Chemische Verfahren zum Antibiotikanachweis sind zu kostspielig und bedürfen eines zu großen arbeitstechnischen Aufwandes. Mikrobiologische Verfahren zum Hemmstoffnachweis zeichnen sich durch ein breites Nachweisspektrum, ausreichende Spezifität und geringen zeitlichen und personellen Aufwand aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Erarbeitung eines Schnellverfahrens zur Hemmstofffeststellung beim Schlachttier unter Verwendung des *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 sein, der sich durch ein besonders rasches Wachstum auszeichnet. Gleichzeitig sollte dieser Keim hinsichtlich seiner Aussagekraft mit *Bac. subtilis*, Stamm BGA, verglichen werden.

## B Schrifttum

### I Hemmstoffe

#### 1. Antibiotika und Chemotherapeutika

Antibiotika und Chemotherapeutika sind chemisch definierte Stoffe mit bakteriostatischer oder bakterizider Wirkung in vivo oder vitro. Von Antibiotika spricht man, wenn sie Stoffwechselprodukte von "Mikroorganismen" sind, von Chemotherapeutika, wenn sie vom Chemiker synthetisiert werden.

Mit der Aufklärung der chemischen Struktur der Antibiotika, der theoretischen und praktischen Möglichkeit der ganzen oder teilweisen Synthese sowie der chemischen Abwandlung der Stoffe wird eine zuverlässige Abgrenzung gegen die Chemotherapeutika schwierig. Chemotherapeutika stellen daher den übergeordneten Begriff für beide Substanzgruppen - die Antibiotika und Chemotherapeutika im engeren Sinne - dar (WALTER und HEILMEYER, 1965; KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1972). Die Einteilung der Chemotherapeutika kann nach ihrem Wirkungsspektrum oder nach chemischen Gruppen erfolgen. Letzterer wird von HELWIG (1973) aufgrund der Weiterentwicklung der Penicilline und der Überschneidung der verschiedenen Wirkungsbereiche der Vorzug gegeben. In Anlehnung an HELWIG (1973) kann folgende Einteilung vorgenommen werden:

##### a) Penicilline

Penicillin G wurde ursprünglich aus dem Pilz *Penicillium notatum*, später von *Penicillium chrysogenum* gewonnen. Durch Einführung verschiedener Acylreste an die Grundsubstanz 6-Aminopenicillansäure, die biologisch aus Penicillin G gewonnen wird, können halbsynthetische Penicilline hergestellt werden. Veränderungen der Seitenketten der 6-Aminopenicillansäure bedingen Wirkungsunterschiede, unterschiedliche Löslichkeit und Stabilität.

Die Penicilline werden folglich eingeteilt in:

1. Biologische und biosynthetische Penicilline wie Penicillin G und Penicillin V, wobei Penicillin G rein biologisch aus Pilzkulturen und Penicillin V durch gelenkte Biosynthese gewonnen wird.
2. Halbsynthetische Penicilline wie Phenthicillin, Propicillin, Meticillin, Oxacillin, Nafcillin, Ampicillin, Hetacillin, Carbencillin und weitere, die sich jedoch nur wenig von anderen Penicillinen unterscheiden.

b) Cephalosporine

Die Cephalosporine sind Derivate der 7-Aminocephalosporansäure, die chemisch mit der 7-Aminopenicillansäure verwandt ist.

c) Chloramphenicol

Chloramphenicol wurde 1947 aus dem Pilz Streptomyces venezuelae isoliert. Seit 1950 wird es nur noch vollsynthetisch hergestellt. Chemisch ist es ein D-(-)-threo-1-p-Nitrophenyl-2-dichloracetyl-aminopropan-1,3-diol.

d) Tetracycline

Die ersten Tetracycline wurden aus dem Strahlenpilz Streptomyces aureofaciens und aus Streptomyces rimosus isoliert. Aus ersterem entstand Chlortetracyclin aus letzterem Oxytetracyclin. Tetracyclin stellt das antibiotisch wirksame Grundgerüst der Antibiotika der Tetracyclingruppe dar, wobei das Naphthacen-Ringsystem als chemische Grundstruktur dient.

e) Aminoglykosidantibiotika

Zu den Aminoglykosidantibiotika gehören Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Paromomycin und Gentamycin. Sie sind verwandt im Aufbau, Wirkungsbereich und der Pharmakokinetik.

f) Makrolidantibiotika

Die Makrolide sind makrozyklische Laktone, die aus einem vielgliedrigen Laktonring, einem basischen Aminozucker und Neutralzucker bestehen. Die bekanntesten Makrolidantibiotika sind Erythromycin, Oleandomycin und Spiramycin.

g) Polypeptidantibiotika

Zu dieser Gruppe gehören Bacitracin, Polymyxin, Tyrothricin, Viomycin, Amphotericin und Capreomycin.

h) Polyenantibiotika

i) Peptolidantibiotika

k) Antibiotika verschiedener chemischer Strukturen

In diese Gruppe gehören: Cycloserin, Fusidinsäure, Griseofulvin, Lincomycin u.a.

l) Sulfonamide

Als Sulfonamide werden alle therapeutisch verwendeten Sulfanilamidderivate bezeichnet. Durch unterschiedliche Substitution an der Amidogruppe werden Wirkungsstärke, Resorption, Löslichkeit und Ausscheidung verändert.

m) Nitrofuranderivate

n) Nalidixinsäure

o) Trimethoprim

Chemotherapeutika werden bei Mensch und Tier bekanntlich zur Therapie und Prophylaxe von Infektionskrankheiten eingesetzt (WALTER und HEILMEYER, 1965; PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE, 1969). Beim Tier können Chemotherapeutika zusätzlich nutritiv mit dem Futter zur Wachstumsförderung verabfolgt werden (BRÜGGEMANN, 1955; KIRCHGESSNER und FRISECKE, 1967). Neben dem bekannten Nutzen von Chemotherapeutika bei der Heilung von Infektionserkrankungen sind jedoch auch Schäden bekannt, die dem Menschen durch die Anwendung dieser Mittel entstehen können.

Schädigung der menschlichen Gesundheit durch Chemotherapeutika

Die Chemotherapeutika werden im Organismus nach der Resorption mehr oder weniger um- und abgebaut. Dabei liegt der Anteil, der unverändert durch die Ausscheidungsorgane des Körpers eliminiert wird, bei den einzelnen Sub-

stanzen in weiten Grenzen, die von 70 % bis unter 1 % der aufgenommenen Menge reichen können. Der Um- und Abbau im Organismus erfolgt durch Oxydation, Reduktion, Hydrolyse sowie Konjugationsvorgänge. Durch verzögert ablaufende Inaktivierungsvorgänge bei Neugeborenen, Leber- und Nierenkranken, im hohen Alter sowie beim Vorliegen von Fermentanomalien infolge ungenügender Enzymaktivität der Leber kann es zu lebensbedrohlichen Zuständen infolge toxischer Reaktionen kommen. Diese können sowohl durch die unveränderte Substanz als auch durch Um- und Abbauprodukte der Chemotherapeutika bedingt sein. Bei der Anwendung von Streptomycin, Chloramphenicol oder Sulfonamiden kann es zu Nervenschädigungen infolge toxischer Reaktionen kommen, die sich dann in Form von Vestibularisstörungen, Optikusschäden oder Polyneuritis äußern. Parenchymschädigungen der Niere durch Colistin, Bacitracin und Sulfonamide sind bekannt, ebenso Leberschäden durch Sulfonamide und Tetracycline. Gastrointestinale Störungen und toxische Hämopathien können durch Chloramphenicol und Sulfonamide verursacht werden (WALTER und HEILMEYER, 1965).

Von entscheidendem Einfluß bei toxischen Reaktionen ist die Menge der Chemotherapeutika, die von dem zu den beschriebenen Reaktionen neigenden Menschen aufgenommen wird (LENDLE, 1962).

Nebentoxischen Reaktionen stellen allergische Reaktionen eine zunehmende Gefahr beim Einsatz von Chemotherapeutika und Antibiotika dar. Folgende allergischen Syndrome und allergischen Hämopathien, hervorgerufen durch Chemotherapeutika, sind bekannt: Fieber und Eosinophilie können durch fast alle Antibiotika und Sulfonamide verursacht werden; ebenso Organmanifestationen in Form von Reaktionen der Haut und Schleimhäute, die sich als Urticaria, Exanthem oder Glottisödem äußern. Immunhämopathien wie Agranulozytose, allergische Leukopenie oder Anämie können durch Sulfonamide, Chloramphenicol oder Tetracycline hervorgerufen werden. Ein anaphylaktischer Schock schließlich kann durch Penicillin,

seltener durch Streptomycin, Sulfonamide oder Tetracycline ausgelöst werden (WALTER und HEILMEYER, 1965; HAPKE, 1970).

Von Bedeutung ist, daß allergische Reaktionen, im Gegensatz zu toxischen, schon durch kleinste Dosen ausgelöst werden können (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1972). Allergische Erscheinungen treten beim Menschen nicht nur nach wiederholter therapeutischer Anwendung von Chemotherapeutika auf, sondern auch der Verzehr antibiotikahaltiger Lebensmittel kann die Ursache sein (BISPING, 1962).

So berichten SINELL (1967) und OBIGER (1970) von Allergiefällen, die durch Milch penicillin behandelter Kühe hervorgerufen wurden. TSCHEUSCHNER (1972) beschreibt den Fall einer anaphylaktischen Reaktion nach dem Genuß von Fleisch eines vor der Schlachtung therapeutisch mit Penicillin behandelten Schweines. Bei dem Patienten war eine Penicillinallergie bekannt.

Ein weiteres zunehmend an Bedeutung gewinnendes Problem beim Einsatz von Chemotherapeutika ist die bakterielle Resistenz. Bei der Resistenzbildung von Mikroorganismen gegen Chemotherapeutika spielt eine Vielzahl von Vorgängen eine Rolle. GERLACH (1967) unterscheidet zwischen Veränderungen des Genotyps und nichterblichen Veränderungen des Phänotyps. Die erste Gruppe - Veränderungen des Genotyps - muß unterteilt werden in Mutation, Transformation, Transduktion und plasmatische Vererbung. In der zweiten Gruppe - nicht erbliche Veränderungen des Phänotyps - wird unterschieden zwischen Induktion von Enzymbildung, Verlust von Zellorganellen und Blockierung von Enzymen.

Eine besondere Bedeutung bei der Resistenzbildung hat die plasmatische Vererbung, bei der die Resistenz gegen mehrere Antibiotika nicht nur auf Stämme der gleichen Spezies, sondern sogar auf Stämme verschiedener Genera übertragbar ist. Der Sitz der entsprechenden genetischen Information sollen Episome sein, die zwischen verschiedenen Bakterien austauschbar sind. Auf diese Weise können Bakterien, die bei Anwendung von Chemotherapeutika eine Antibiotikaresistenz entwickelt haben,

diese mit Hilfe der Episome bzw. sogenannter R-Faktoren auch auf nicht mit Antibiotika in Berührung gekommene Bakterien übertragen.

Mikroorganismen aus der Familie der Enterobacteriaceae spielen nach KNOTHE (1971) sowie BULLING, STEPHAN und SEBEK (1971) in diesem Zusammenhang die wichtigste Rolle und hier besonders die Salmonellen. Die Autoren stellten eine Zunahme antibiotikaresistenter Salmonellenstämme fest und führen dies auf die verbreitete Anwendung von Chemotherapeutika bei Mensch und Tier sowie die Möglichkeit der Resistenzübertragung durch R-Faktoren zurück. Bei therapeutischer und nutritiver Anwendung von Antibiotika sollen durch Selektion resistente coliforme Darmkeime entstehen, die diese Eigenschaft auf Salmonellen übertragen können.

Eine weitere Form von Resistenzbildung wird von GERLACH (1972) bei der Entstehung von L-Formen beschrieben. Bei diesen L-Formen handelt es sich um Bakterien, die u.a. auch durch den Einfluß von Antibiotika in Form von Granula überleben und sich vermehren können. Kennzeichnend ist für sie das Fehlen einer festen Zellwand und die Möglichkeit einer Rückverwandlung in die parenterale Form. Die L-Form ist weitgehend unempfindlich gegen das Antibiotikum, durch das sie entstanden ist.

Resistente Bakterien stellen für den Menschen eine immer größer werdende Gefahr dar. Gefährliche Erreger von Krankheiten entziehen sich in zunehmendem Maße der therapeutischen Beeinflussung (KNOTHE, 1971).

Außer den oben beschriebenen möglichen Schädigungen der menschlichen Gesundheit durch Chemotherapeutika ist eine weitere Gefahr für den Menschen in Verbindung mit der Bakteriologischen Fleischuntersuchung bekannt. Bei Verabfolgung von Antibiotika an Tiere vor der Schlachtung kann das Fleisch Hemmstoffe enthalten, die das Ergebnis der Bakteriologischen Fleischuntersuchung beeinflussen können. Eventuell im Fleisch vorhandene apathogene und pathogene Mikroorganismen wachsen durch die Anwesenheit von Antibiotika überhaupt nicht oder nur verzögert.

V. SPROCKHOFF (1960) stellte fest, daß schon geringe Mengen Terramycin im untersuchten Fleisch das Wachstum von Rotlaufkeimen verzögern und bei therapeutisch vor der Schlachtung verabfolgtem Terramycin das Salmonellenwachstum erheblich beeinträchtigt wird. FORSCHNER (1962) fand, daß bei hemmstoffpositiven Tieren stark keimhaltige Organe seltener waren als bei hemmstoffnegativen. Keimfreiheit und schwacher Keimgehalt können nach Ansicht von KLIMA (1966) in antibiotikahaltigen Proben vorgetäuscht werden; dadurch kann es dann zu einer falschen Endbeurteilung des Schlachttieres kommen. MEYER, THIEL und WEIS (1969) stellten ebenfalls ein verzögertes Salmonellenwachstum bei antibiotikahaltigem Untersuchungsmaterial fest. Bei einem Großteil der Proben gelang der Salmonellennachweis erst über das Anreicherungsverfahren. Ebenfalls eine Hemmung des Salmonellenwachstums bei hemmstoffpositiven Proben fanden BONFERT und BERRANG (1969).

Schließlich kann es bei der Verarbeitung von Lebensmitteln tierischer Herkunft zu Fehlprodukten kommen; z.B. können bei der Herstellung hochqualifizierter Milcherzeugnisse Antibiotika im Ausgangsprodukt die unentbehrlichen Milchsäurebakterien schädigen (OBIGER, 1963; SEELEMANN und OBIGER, 1963; BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969; SCHRAUDY und RAUSCHER, 1972).

Antibiotika und Chemotherapeutika können also die Gesundheit des Menschen direkt durch toxische Reaktionen und allergische Reaktionen sowie indirekt durch die Bildung von resistenten Keimen und eine Verschleierung des Ergebnisses der Bakteriologischen Fleischuntersuchung schädigen.

Toxische Reaktionen können nur durch größere Mengen von Chemotherapeutika und hauptsächlich bei alten oder kranken Menschen hervorgerufen werden (WALTER und HEILMEYER, 1965). Allergische Reaktionen jedoch, die von harmlosen Hautreaktionen bis zum anaphylaktischen Schock

reichen, können schon durch allergeringste Mengen von Chemotherapeutika und unabhängig vom Gesundheitszustand des Menschen ausgelöst werden (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1972). Zunehmende Bedeutung erlangt die Bildung von resistenten pathogenen Bakterien, die sich dann der Therapie entziehen (KNOTHE, 1971; BULLING et al., 1971).

Durch das Schlachtvieh sowie über die Milch antibiotisch behandelter Tiere können Antibiotika auch in Lebensmittel gelangen und so vom Menschen aufgenommen werden (BRÜGGEMANN, 1955; PICHNARCIK et al., 1969; GROSSKLAUS, 1970).

Über mögliche Nebenwirkungen beim Menschen während einer Chemotherapie liegt ein umfangreiches Schrifttum vor. Dagegen fehlt es jedoch nach Ansicht von PRÄNDL (1973) an Berichten von Schädigungen der menschlichen Gesundheit durch geringe Antibiotikarückstände in Lebensmitteln, abgesehen von einzelnen Fällen von Allergie nach dem Genuß penicillinhaltiger Milch. Über das Vorkommen und die Häufigkeit allergischer Reaktionen infolge der Aufnahme antibiotikahaltiger Lebensmittel fehlt es außerdem an exakten Angaben (KNOTHE, 1967). Nach KEWITZ (1967) und OBIGER (1970) sollten aber dennoch Rückstände, z.B. Chemotherapeutika in Nahrungsmitteln, soweit wie möglich vermieden werden, da z.Z. die eventuellen Folgen noch nicht abzuschätzen sind. Wegen der jedoch möglichen Gefahren für die menschliche Gesundheit durch rückstandshaltige Lebensmittel ergibt sich nach GEMMER und SEEGER (1970), GROSSKLAUS (1971), LEVETZOW (1971) sowie BARTELS, ANGERSBACH und KLARE (1972) sogar die Notwendigkeit, rückstandshaltige Lebensmittel für den menschlichen Genuß als untauglich zu beurteilen. THIEL (1973) fordert hingegen, daß für sinnvolle Rückstandsuntersuchungen und Beurteilungen von rückstandshaltigen Lebensmitteln erst einmal geklärt werden müsse, in welcher Art und Menge Rückstände in Lebensmitteln für den Menschen gesundheitsschädlich sind.

Nach VAN SCHOTHORST (1970, 1971) können nur solche Antibiotika-Konzentrationen in Lebensmitteln toleriert werden, die kleiner sind als die "Minimalen Hemm-Konzentrationen" (m.i.c.s) für die empfindlichsten Bakterienarten.

## 2. Konservierungs- und Desinfektionsmittel

Neben Antibiotika und Chemotherapeutika sind Konservierungs- und Desinfektionsmittel weitere Hemmstoffe mit bakterizider Wirkung, die Lebensmitteln zur Haltbarkeitsverlängerung zugesetzt werden können bzw. noch Rückstände von Reinigungsvorgängen sind. Von Bedeutung sind diese Stoffe für Getränke, Marmeladen, Speiseeis, Margarine und Fleischwaren (MOSSEL und de BRUIN, 1953; MOSSEL, 1956; BERNARTS, 1956), Gelatine und Fleischkonserven (CORETTI, 1959; DRAGON, 1958; TERPLAN, 1960) und für Milch (DRAGON, 1968, KRAACK und TOLLE, 1969; OBIGER, 1970).

## 3. Natürliche Hemmstoffe

### a) Pflanzliche Hemmstoffe

Antibiotische Wirkstoffe in Pflanzen sind bekannt. Hierzu zählen Kapuzinerkresse, Gartenkresse und andere (WINTER, 1952). Es war daher naheliegend, daß die Hemmstoffe dieser Pflanzen, nachdem sie durch das Tier aufgenommen worden sind, in der Milch und in Organen der Schlachttiere wieder erscheinen (KLIMA, 1966; ZEITTRÄGER, 1970).

### b) Hemmstoffe aus dem tierischen Organismus

1. Körpereigene Stoffe, die das Wachstum von Bakterien beeinflussen können, sind Lysozyme, Phosphatasen, Phospholipasen, Leucozyme (GERLACH, 1972).

2. Abbauprodukte des Blutes und Fäulnisprodukte von Fleisch (KOTTER, 1960; SCHAAL, 1961).

3. Stoffwechselprodukte des Muskels in Form von L-Milchsäure und Brenztraubensäure (VAN SCHOTHORST, 1969).

4. Galle bzw. Gallensäuresalze (KUNDRAT, 1972; OBIGER, 1972).

5. Lactotransferin in Milch, ein an die Kaseinfraktion gebundener Stoff (ASHTON und BUSTA, 1968; OBIGER, 1970).

c) Von Bakterien gebildete Hemmstoffe

Nisin, ein Stoffwechselprodukt von Proteinstruktur, das von verschiedenen Stämmen des Streptococcus lactis gebildet wird.

Diplococcin, eine dem Nisin ähnliche Substanz, gebildet von Streptococcus cremoris (OBIGER, 1963).

d) Bakteriophagen

4. Hemmstoffe unbekannter Natur

Bei GALESLOOT und HASSING (1962) enthielten einige der zu ihren Versuchen benutzten Papierscheibchen Hemmstoffe.

Von Bedeutung können natürliche und unbekannte Hemmstoffe bei einigen der nachfolgend beschriebenen Hemmstoffnachweisverfahren sein, da sie unter Umständen fälschlich als Antibiotika bzw. Chemotherapeutika in Lebensmitteln gemäßregelt werden könnten (GALESLOOT und HASSING, 1962; KLIMA, 1966; VAN SCHOTHORST, 1970; LANGNER, TEUFEL, SIEGER und FROMMHOLD, 1973).

## II. Hemmstoffnachweisverfahren

Von zahlreichen Autoren ist die Bedeutung und Notwendigkeit des Nachweises von Antibiotika und Hemmstoffen in Lebensmitteln herausgestellt worden (KOTTER, TERPLAN und SCHULZ, 1959; PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE, 1969; MEYER, THIEL und WEIS, 1969; BARTELS, ANGERSBACH und KLARE, 1972; TERPLAN, ZAADHOF und MATTHEIS, 1972; BECK und MANTEL, 1972).

Bekannt sind chemische bzw. physiko-chemische, mikrobiologische und mikrobiologisch-chemische Nachweisverfahren.

### 1. Chemische bzw. physiko-chemische Verfahren zum Antibiotikanachweis

Der Nachweis von Hemmstoffen mit chemischen Methoden kann über die Identifizierung einer charakteristischen Komponente, wie z.B. der Guanidinogruppen im Streptomycin und des Chlors im Chloramphenicol, seltener über eine nicht antibiotische Komponente (Procain) oder durch die Feststellung bestimmter Absorptionsmaxima im UV-Bereich und die des optischen Drehungsvermögens erfolgen (BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969).

Nach Ansicht von KLIMA (1966), MEYER et al. (1969) sowie PICHNARCIK et al. (1969) sind diese Verfahren jedoch wegen des großen arbeitstechnischen und kostspieligen Aufwandes für die Routinediagnostik nicht geeignet.

LANGNER und TEUFEL (1972) beschreiben eine Methode, bei der mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Antibiotika getrennt und dann im langwelligen und kurzwelligen UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein Nachteil ist nach Angaben der Autoren die wesentlich geringere Empfindlichkeit dieses Testes gegenüber mikrobiologischen Verfahren; sie empfehlen daher eine Kombination beider Methoden.

## 2. Mikrobiologische Verfahren zum Hemmstoffnachweis

Die mikrobiologischen Hemmstoffnachweisverfahren beruhen auf dem Prinzip, daß das Wachstum von Testbakterien oder Pilzen durch die Anwesenheit von Hemmstoffen in der fraglichen Probe (Lebensmittel) beeinflusst wird. Diese Beeinflussung bzw. Hemmung wird direkt oder indirekt (mit Hilfe eines Indikators) sichtbar gemacht.

Die Nachweisverfahren können eingeteilt werden in:

### a) Verfahren mit Flüssignährböden

Hierbei dient das zu untersuchende Material - Milch, Extrakt aus Organen oder Fleischkonserven - als Nährboden.

NEAL und CALBERT (1956) entwickelten eine Schnellmethode zum Hemmstoffnachweis in Milch. Die zu untersuchende Probe wurde auf  $+ 80^{\circ}\text{C}$  erhitzt; dadurch wurden die milcheigenen Inhibine inaktiviert und die stets vorhandenen reduzierenden Keime abgetötet sowie eventuell vorhandene Bakteriophagen ausgeschaltet. Nach Abkühlung wurde die Milch mit Testbakterien beimpft und dann 2 Stunden bei  $+ 37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Nach Zugabe von TTC-Lösung (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) wurde erneut für 30 Minuten bebrütet. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen blieb die Milch weiß; fand keine Hemmung der Testkeime statt - bei hemmstofffreien Proben - wurde das fast farblose TTC zu rotem Formazan durch Fermente der Testkultur reduziert.

KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959) modifizierten den TTC-Test von NEAL und CALBERT (1956) für Fleischuntersuchungen. Fragliche Nierenproben wurden mit Dextrosebouillon extrahiert und der Extrakt 5 Minuten auf  $+ 80^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um die Eigenhemmung des Organs und eventuell vorhandene Bakterien auszuschalten. Nach Abkühlung auf  $+ 37^{\circ}\text{C}$  wurde der Extrakt mit einem Testkeim beimpft. Die weitere Durchführung der Untersuchung

erfolgte analog der Originalmethode. Das Ergebnis war auch hier nach 2 1/2 Stunden ablesbar. Hemmstofffreie Proben verfärbten sich intensiv rot, bei hemmstoffhaltigen fand keine oder nur eine schwache Verfärbung statt. Leber und Milz waren wegen ihrer Eigenfarbe für den Test unbrauchbar.

CORETTI (1961) vereinfachte das Verfahren von KOTTER et al. (1959), indem er den Extrakt nicht mehr erhitzte, sondern gleich beimpfte und bebrütete.

TERPLAN (1960) stellte ebenfalls einen Extrakt aus fraglichen Fleischkonserven her, beimpfte diesen mit einem katalasebildenden Testkeim und bebrütete für 3 Stunden. Dann wurde eine 2 %ige  $H_2O_2$ -Lösung zugegeben, das Glas verschlossen und umgedreht; durch ein Glasrohr im Stopfen konnte Flüssigkeit abtropfen. Gemessen wurde die durch Bakterienkatalase aus  $H_2O_2$  abgespaltene Sauerstoffmenge und je nach Menge auf Anwesenheit oder Fehlen von Hemmstoffen geschlossen (Vergleich mit einer hemmstofffreien Kontrolle). Vorteile gegenüber der mit dem gleichen Keim durchgeführten TTC-Methode waren, daß die Eigenfarbe oder Trübungen des Extraktes bei der Katalase-Methode keine Rolle mehr spielte; außerdem konnte der Test auch bei pH 5,0 durchgeführt werden, wodurch auch Konservierungsmittel nachweisbar waren, die ein Optimum in diesem Bereich haben.

Bei Milch kann das Verfahren mit Flüssignährböden neben der Reduktionsprobe auch als Säuerungsprobe angewendet werden.

WELZ (1961) beschreibt eine Säuerungsmethode mit Lackmuslösung. Er erhitzte die zu untersuchende Milch auf + 80° C, kühlte auf + 40° C ab und beimpfte nach Zugabe von Lackmuslösung mit Testbakterien. Nach Bebrütung konnte das Ergebnis nach 2, 2 1/2, 3, 5 und 24 Stunden abgelesen werden. Hemmstofffreie Milch war dickgelegt und gerötet, hemmstoffhaltige unverändert und blau.

OBIGER (1963) verglich nach Beimpfung mit Testbakterien die Säuerung der Verdachtsmilch mit hemmstofffreien Kontrollproben.

b) Verfahren mit festen Nährböden (auch Direktmethode, Diffusionsverfahren oder Plattendiffusionstest genannt)

Diesen Verfahren gemeinsam ist die Verwendung von festen Nährböden, auf oder in die der Testkeim gebracht wird (Suspensionsverfahren). Fragliche Proben werden dann auf diese Testplatte verbracht. Eventuell vorhandene Hemmstoffe diffundieren in den Agar und verhindern so bei nachfolgender Bebrütung das Wachstum des Testkeims um das zu untersuchende Material. Die Beurteilung erfolgt an Hand von sichtbaren wachstumsfreien Zonen. In den Agar kann zusätzlich, um das Bakterienwachstum noch deutlicher zu machen, ein Indikator gemischt sein.

Nach der Art der Materialauftragung kann man folgende Verfahren unterscheiden:

Gefrierblockmethode nach GARTSIDE (1960) oder FORSCHNER (1962)

Bei GARTSIDE (1960) wurden tiefgefrorene Organzylinder in ausgestanzte Löcher des mit dem Testkeim beimpften Agars gestellt. FORSCHNER (1962) vereinfachte die Originalmethode; er kühlte das zu untersuchende Material auf minus 20° C und legte es einfach auf den beimpften Agar. Nach erfolgter Bebrütung von 12 bis 18 Stunden konnten bei hemmstoffpositiven Proben um die Organproben deutliche, mehr oder weniger große wachstumsfreie Zonen beobachtet werden.

Auflegeverfahren ohne Vorbereitung des Materials

BONFERT und BERRANG (1969) vereinfachten den Plattendiffusionstest, indem sie das zu untersuchende Material ohne Vorbehandlung auf das Keim-Agargemisch stellten. Die Autoren hielten es dann aber für nötig, die Platten drei Stunden im Kühlschrank aufzubewahren, damit eventuell vorhandene Hemmstoffe in den Agar diffundieren können, bevor der Testkeim wächst. Die Bebrütungszeit betrug 18 Stunden.

Vom "Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" (ALTS) wurde das gleiche Verfahren, jedoch ohne Vordiffusion empfohlen (LEVETZOW, 1971).

#### Blättchenmethode

Bei CORETTI (1961) wurden zerkleinerte Fleischwaren in Pufferlösung mit Rundblättchen extrahiert - Puffer-Schnellextraktionsmethode - und diese Blättchen dann auf den mit dem Testkeim beimpften Agar gelegt und 18 Stunden bebrütet. Als Direktauszugs-Methode bezeichnet der gleiche Autor ein Verfahren, bei dem die Blättchen in die frisch angelegte Schnittfläche der Probe gelegt und nach 5 Minuten auf den Agar verbracht wurden.

KUNDRAT (1968 und 1972) verwendete die Direktauszugsmethode und Filterblättchen bei Untersuchungen von Schlacht-tierorganen. Er entwickelte einen Schnelltest, der bereits nach 45 Minuten abzulesen war (Beschreibung des Verfahrens im Kapitel "Mikroorganismen zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis").

GALESLOOT und HASSING (1962) benutzten die Blättchenmethode für Milch. Filterpapierscheibchen wurden mit der zu untersuchenden Probe getränkt, auf den Agar gelegt und dann bebrütet. Durch die Wahl eines geeigneten Testkeimes war das Ergebnis nach 2 1/2 Stunden bereits abzulesen.

#### Agar-Lochtestverfahren

CORETTI (1959) stanzte in oberflächlich mit einem Testkeim beimpfte Agarplatten Löcher, in die die zu untersuchende Gelatine eingebracht wurde. Nach 18-stündiger Bebrütung konnten bei Anwesenheit von Hemmstoffen wachstumsfreie Zonen ausgemessen werden. Für Organextrakte wurde die Lochplattenmethode von MEYER, THIEL und WEIS (1969) verwendet.

TERPLAN und ZAADHOF (1969) modifizierten das Verfahren für einen Schnelltest bei Milch. Sie verwendeten ein

Agar-Keimgemisch und einen anderen Testbacillus. Das Ergebnis war bereits nach 3 1/2 bis 4 Stunden Bebrütung abzulesen.

#### Zylindermethode

Nach OBERZILL (1962) werden in den Agar Zylinder gesteckt, die dann mit der fraglichen Flüssigkeit gefüllt werden.

#### Mikrotiterschalen-Test für Milch und Urin

KRAACK und TOLLE (1967) entwickelten einen Schnelltest für Milch. Sie verwendeten ein Agar-Keim-Gemisch mit einem Farbindikator, das sie in Mikrotiterschalen füllten. Im Gegensatz zu den vorherigen Methoden ist hier die Menge des Agars sehr klein, so daß Hemmhöfe im eigentlichen Sinn nicht mehr abzulesen sind. Mit Hilfe eines Indikators - Brillantschwarz - wird das Wachstum des Testkeimes in der gesamten Agarmenge indirekt sichtbar gemacht. Bei hemmstofffreien Proben konnte der Testkeim wachsen, und die blau-violette Oxydationsstufe des Redoxindikators Brillantschwarz wurde in die gelbe Reduktionsstufe überführt. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen wuchs der Testkeim nicht, die Reaktion unterblieb, und das Testgemisch behielt seinen blau-violetten Farbton. Das Ergebnis war nach 2 1/2 Stunden Bebrütung ablesbar.

VAN SCHOTHORST (1970) modifizierte dieses Verfahren für einen Schnelltest beim Schlachttier. Er verwendete als Untersuchungsmaterial Urin, von dem er einen Tropfen in die mit dem Agar-Testkeim-Gemisch gefüllten Vertiefungen der oben genannten Schalen pipettierte. Nach einer Diffusionszeit von einer Stunde wurde das Übermaß an Flüssigkeit aus der Vertiefung entfernt. Das Ergebnis war nach 2 - 3 Stunden Bebrütung abzulesen. Der Autor empfiehlt den Test als "screening" Methode bei normalen Schlachtungen.

Die Verfahren mit festen Nährböden wurden von anderen Autoren noch variiert. Es kamen verschiedene Testkeime zur Anwendung, die eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen (Antibiotika) haben sowie für die Testzeit von Bedeutung sein können (im Kapitel "Mikroorganismen zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis" abgehandelt).

Eine weitere Variante besteht in dem Einsatz von Farb-indikatoren. KUNDRAT (1968 und 1972) z.B. verwendete bei Organuntersuchungen von Schlachttieren Indikatoren zur deutlicheren Sichtbarmachung der Hemmhöfe. FORSCHNER (1972) setzte bei Milchuntersuchungen dem Agar-Keim-Gemisch Lackmus oder Brillantschwarz aus dem gleichen Grunde zu.

c) Verfahren, bei dem morphologische Veränderungen des Testkeimes mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

OBIGER (1963) beimpfte eine Verdachtsmilch mit Testkeimen und fertigte nach Bebrütung einen Ausstrich an. Unter Einwirkung von Antibiotika waren morphologische Veränderungen der Testbakterien sichtbar geworden. Die Testkeime wuchsen zu irregulären Ketten aus, einzelne Bakterien waren aufgetrieben und in die Länge gezogen.

In jüngerer Zeit wurde beim mikrobiologischen Hemmstoffnachweis in Lebensmitteln von den drei Möglichkeiten - Verfahren mit Flüssignährböden, Verfahren mit festen Nährböden und Verfahren, bei dem morphologische Veränderungen des Testkeimes sichtbar gemacht werden - der Methode mit festem Nährboden der Vorzug gegeben, da sie den Anforderungen im Routinebetrieb am ehesten gerecht wird (OBIGER, 1972). Von den verschiedenen Möglichkeiten bei diesem Verfahren wird vom "Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" die Auflegemethode ohne Vorbereitung des Materials für den Hemmstoffnachweis beim Schlachttier empfohlen (LEVETZOW, 1971).

Von PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE (1969) wurde auf die Notwendigkeit einer Standardisierung des mikrobiologischen Hemmstofftestes zur Erlangung reproduzierbarer Ergebnisse verwiesen.

Folgende Faktoren spielen bei der Ausbildung der Hemmzonen nach OBERZILL (1962) eine Rolle:

1. Art des verwendeten Teststammes
2. Physiologischer Zustand der Testkeime
3. Einsaatdichte
4. Bebrütungstemperatur
5. Beschaffenheit des Nährmediums
6. Agarschichtdicke
7. Art der Aufbringung des Materials

Im Anschluß an eigene Versuche empfahlen PICHNARCIK et al. (1969) folgende Punkte zur Standardisierung des Testes:

a) Verwendung von Bac. subtilis als Testkeim

Bac. subtilis hat sich gegenüber Antibiotika-Reinsubstanzen und hemmstoffhaltigem Untersuchungsmaterial als besonders empfindlich erwiesen.

b) Bazillen-Agargemisch

Bei Verwendung des Bazillen-Agargemisches wurden größere Hemmhöfe als bei einfacher Oberflächenbeimpfung erzielt. Außerdem waren die Hemmhöfe noch schärfer begrenzt.

c) Einsaat von  $10^4$  Sporen pro ml Agar

Die einheitliche Verwendung von  $10^4$  Sporen pro ml Agar wurde empfohlen, da durch unterschiedliche Keimzahlen - trotz gleicher Konzentration der Antibiotika - die Hemmhofgrößen verändert werden.

d) Agarschichtdicke von 2 mm

Für die Reproduzierbarkeit ist auch die Agarschichtdicke von Bedeutung. Bei einer Zunahme derselben wird die Hemmhofgröße verkleinert.

e) Der Doppelansatz mit pH 6,0 und 8,0

Der Doppelansatz muß durchgeführt werden, da verschiedene Antibiotika ihre optimale Wirkung in verschiedenen pH-Bereichen haben.

f) Niere und Muskulatur als Untersuchungsmaterial

In den Nieren befanden sich die größten Antibiotikakonzentrationen, in der Muskulatur die niedrigsten. Aus praktischen Gründen sollen nur diese beiden Proben untersucht werden.

Von KUNDRAT (1968) wurde die Verwendung von Sporen empfohlen, um Stabilität, gleiches physiologisches Alter und gleiche Einsaatmenge für den Testkeim sicherzustellen. Auf den Einfluß der Anzahl von Mikroorganismen auf Hemmstoffe im Testsystem wies auch GERLACH (1967) hin. Bei Anwesenheit von mehr Keimen werden die Hemmhöfe bei gleicher Hemmstoffmenge entsprechend kleiner.

Auf die Bedeutung der Schichtdicke beim Bazillenagarmisch wurde bereits von KISSLING (1959) sowie von TERPLAN und ZAADHOF (1969) hingewiesen. Durch dünnere Nährbodenschichten können niedrigere Grenzkonzentrationen festgestellt werden.

KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959), FORSCHNER (1962), BONFERT und BERRANG (1969) empfahlen ebenfalls die Niere für Hemmstoffuntersuchungen bei Schlachttieren, da hier mit der größten Antibiotikakonzentration gerechnet werden kann.

WENZEL (1971) stellte bei Krankschlachtungen in der Niere die größten Hemmstoffmengen fest; er betont jedoch auch die Notwendigkeit, die Muskulatur ebenfalls zu untersuchen. Bei hemmstoffpositiven Normalschlachtungen fand er eine fast gleichmäßige Verteilung der Hemmstoffe in den Organen und der Muskulatur.

Nach LEVETZOW (1971) empfahl der "Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" (ALTS) zunächst folgende Arbeitsanweisung zur Standardisierung des mikrobiologischen Hemmstofftestes, auch allgemeiner Hemmstofftest genannt:

1. Agardiffusionstest mit Agar-Sporengemisch ( $10^4$  Sporen/ml Agar)
2. Bac. subtilis BGA als Testkeim

3. Doppelansatz der Nährböden mit einem pH-Wert von 6,0 und 8,0
4. Auflage eines etwa erbsengroßen Stückes Niere; beim Fehlen von Niere Ersatz durch Leber bzw. Muskulatur
5. Bebrütung des Testsystems mindestens 18 Stunden bei  $+ 30^{\circ} \text{C}$
6. Bewertung einer Hemmzone von mindestens 1 mm als positiv

Auf eine Vordiffusion zum Ausgleich unterschiedlicher Diffusionsgeschwindigkeit von Antibiotika wurde verzichtet, da sie keine wesentlichen Vorteile versprechen soll (LEVETZOW, 1971; OBIGER, 1972).

Der Wert der Vordiffusion ist ohnehin umstritten (GERLACH, 1967). Andere Autoren stellten empfindlichere Reaktionen des Testsystems nach 3 bis 4-stündiger Vordiffusion fest (BONFERT und BERRANG, 1969; MEYER, THIEL und WEIS, 1969; PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE, 1969; SCHAFER, 1970).

1972 ergänzte das Bundesgesundheitsamt die Standardisierung des allgemeinen Hemmstofftestes durch folgende Punkte:

1. Vorschrift eines bestimmten Nährbodens
2. Einstellung des pH-Wertes mit HCl bzw. NaOH
3. Schichtdicke des Agar-Sporengemisches von 2 mm

In neueren Veröffentlichungen wurde fast ausschließlich dieser ALTS-Test mit teilweise geringen Varianten - meist Gefrierblockmethode nach FORSCHNER (1962) - benutzt (MANTEL, 1971; HEILMANN, 1971; ROTH, 1971; NASSAL und NIEPER, 1971; BARTELS, ANGERSBACH und KLARE, 1972; GEMMER, SEEGER und HAASE, 1973).

## 2.1. Mikroorganismen zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis

Als erster entwickelte BLYTH (1901) einen mikrobiologischen Test, um Konservierungsmittel (Borsäure, Salicylsäure und Formaldehyd) in Lebensmitteln nachzuweisen. Er verwendete Milchsäurebakterien als Testkeime

und als Indikator des Wachstums Lackmuslösung.

Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) wurde von KLUYVER (1914) für einen Gärungstest zum Hemmstoffnachweis eingeführt.

Eine andere Hefe nahm BERNAERTS (1956); er verwendete Saccharomyces rouxii.

DRIEUX und THIERY (1944) benutzten Serratia marcescens-Bakterien, um Hemmstoffe in Fleischwaren zu erkennen.

In jüngerer Zeit wurden fast nur noch Bakterien bzw. Bazillen als Testmikroorganismen benutzt, da mit diesen auch Antibiotika und Chemotherapeutika in Lebensmitteln nachgewiesen werden können; mit den Hefen ist dies nicht möglich (MOSSEL, 1956).

NEAL und CALBERT (1956) verglichen Streptococcus thermophilus und ein Säureweckergemisch beim Hemmstoffnachweis in Milch.

Von den verwendeten Keimen erwies sich Streptococcus thermophilus den Säureweckern überlegen, da mit ihm niedrigere Antibiotikakonzentrationen nachweisbar waren.

WELZ (1961) verglich die Leistungsfähigkeit von Streptococcus thermophilus und Joghurtkulturen bei Milchuntersuchungen auf Hemmstoffe. Die Joghurtkulturen erwiesen sich als überlegen, da mit ihnen das Ergebnis schneller abzulesen war.

1964 schlossen RACKOW und WELZ weitere Untersuchungen mit Joghurtkulturen als Testmikroben und Lackmuslösung als Indikator bei Milch an.

OBIGER (1963) untersuchte folgende Milchsäurebakterien auf ihre Resistenz bzw. Sensibilität gegenüber Hemmstoffen (Antibiotika, Sulfonamide, Reinigungs- und Des-

infektionsmittel):

Streptococcus (Sc.) thermophilus, Sc. lactis, Sc. cremoris, Laktobazillus (Lb.) bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. acidophilus, Joghurtkulturen und Buttereisäurewecker.

Am geeignetsten für den Hemmstoffnachweis in Milch erwiesen sich Sc. thermophilus und Lb. bulgaricus. Bacillus (Bac.) subtilis, Staphylococcus (Staph.) aureus und Sarcina lutea, die außerdem noch auf ihre Brauchbarkeit für den Hemmstoffnachweis in Milch untersucht wurden, bewährten sich nicht, da die Nachweisgrenze für Penicillin zu hoch lag.

MATTICK, ANDERSON und WILDASIN (1955) verwendeten Micrococcus pyogenes var. aureus zur Bestimmung von Penicillin. Durch den Testkeim wurde Nitrat zu Nitrit reduziert, bzw. bei Anwesenheit von Penicillin blieb diese Reaktion aus.

TERPLAN (1960) nutzte die Katalasebildung von Staph. aureus ATCC 6583 aus, um die Aktivität dieses Testkeimes zu verfolgen. Bei hemmstoffhaltigem Untersuchungsmaterial konnte keine Katalasebildung nachgewiesen werden.

KRETZER (1962) verwendete den gleichen Keim bei verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft und ermittelte optimale Bedingungen für den Katalasetest.

Von CORETTI (1959) wurde Bac. cereus ATCC 9634 zum Hemmstoffnachweis in Gelatine benutzt.

KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959) benutzten Micrococcus pyogenes var. aureus ATCC 6538-P, der Antibiotika und Konservierungsmitteln gegenüber eine besonders große Empfindlichkeit aufweist.

Bac. cereus und Bac. subtilis wurden von SCHULZ (1962) für die Verwendung beim TTC-Schnelltest für Fleisch und Organe überprüft, konnten aber nicht genommen werden, da das Sichtbarwerden des Wachstums zu lange Zeit in Anspruch nahm. Dagegen benutzte der Autor mit Erfolg Staph. aureus ATCC 6538-P; dieser Keim vermehrt sich rasch, reduziert schnell Redoxindikatoren und weist

eine große Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen auf.

Staph. aureus ATCC 6538 wurde von PIENING (1962) im Diffusionstest bei Schweinenieren verwendet.

KISSLING (1959) benutzte erstmals ein Bazillenagarmisch mit Bac. cereus, um in tierischem Gewebe Antibiotika nachzuweisen.

Ebenfalls Bac. cereus wurde von SCHAAL (1961), KLIMA (1966) und BARTELS (1970) im Agardiffusionstest benutzt, um Organe von Schlachttieren auf Hemmstoffe zu untersuchen.

In neuerer Zeit wurde für den allgemeinen Hemmstofftest bei Fleisch und Fleischwaren immer mehr Bac. subtilis als Testkeim verwendet.

CORETTI (1961) untersuchte Fleischkonserven, Würstchen und Brühwurstbrät auf Hemmstoffe (Antibiotika). Er verglich folgende Methoden und Testkeime auf ihre Leistungsfähigkeit:

1. Methode nach KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959), TTC-Verfahren mit Staph. aureus ATCC 6538 als Testkeim.
2. Die Puffer-Schnellextraktion mit Rundblättchen und Bac. cereus ATCC 9634 als Testkeim.
3. Das Direktauszugs-Verfahren mit Rundblättchen und Bac. cereus als Testkeim.
4. Die Gefrierblockmethode nach GARTSIDE (1960) mit Bac. subtilis CN/841 der Glaxo-Laboratories als Testkeim.
5. Eine Vereinfachung der Methode nach KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959) mit Staph. aureus als Testkeim.
6. Die Agarlochtest-Methode für Gallerten und Flüssigkeiten mit Bac. cereus als Testkeim.

Bac. subtilis erwies sich am empfindlichsten gegen Antibiotika. Von den Methoden am leistungsfähigsten waren die Gefrierblockmethode, die TTC-Reduktionsmethode und der Agarlochtest nach CORETTI (1959).

Den gleichen Subtilis-Stamm wie CORETTI (1961) verwen-

dete FORSCHNER (1962). Er injizierte Meerschweinchen Antibiotika und Chemotherapeutika. Nach der Tötung konnte er Hemmstoffe in den Nieren der Tiere immer nachweisen, in den anderen Organen nur teilweise. LORENZ (1967) benutzte ebenfalls Bac. subtilis als Testkeim, verbrachte aber die zu untersuchenden Organproben unvorbehandelt (nicht gefroren) auf das Testgemisch.

PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE (1969) verglichen Bac. cereus (München), Bac. subtilis (Bremen) und Staph. aureus (Krefeld) beim biologischen Nachweis von Antibiotika und Chemotherapeutika ("SEBAS-Testtablett" und Reinsubstanzlösungen); außerdem benutzten die Autoren diese Keime beim Hemmstoffnachweis in Nieren von nachweislich mit Antibiotika behandelten Schlachttieren. Bac. subtilis (Bremen) erwies sich als der empfindlichste Testkeim gegen Antibiotika und Chemotherapeutika und als leistungsfähigster Keim für den Hemmstoffnachweis beim Schlachttier.

MEYER, THIEL und WEIS (1969) verwendeten ebenfalls Bac. cereus (München), Bac. subtilis (Bremen) und Staph. aureus (Krefeld), außerdem noch Staph. aureus (München) beim Hemmstoffnachweis bei Schlachttieren (Niere, Leber, Milz und Muskulatur). Von den Testkeimen erwies sich auch hier Bac. subtilis als der beste.

Weitere Autoren (BONFERT und BERRANG, 1969; GISSKE, WENZEL, PICHNARCIK, SCHAPER und ENNEN, 1970; SCHAPER, 1970 und WENZEL, 1971) untersuchten ebenfalls Bac. cereus, Bac. subtilis und Staph. aureus auf ihre Leistungsfähigkeit für den allgemeinen Hemmstofftest bei Schlachttieren. Auch bei ihnen erwies sich Bac. subtilis als der empfindlichere Testkeim.

Nur noch Bac. subtilis als Testkeim wurde von MANTEL (1971), HEILMANN (1971), ROTH (1971) sowie NASSAL und NIEPER (1971) benutzt.

Vom "Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" (ALTS) wird Bac. subtilis BGA für den allgemeinen Hemmstofftest empfohlen (LEVETZOW, 1971).

Verschiedene *Bac. subtilis*-Stämme benutzten BARTELS, ANGERSBACH und KLARE (1972); sie konnten mit *Bac. subtilis* BGA mehr hemmstoffpositive Proben bei Normalschlachtungen finden als mit *Bac. subtilis* ATCC 6633.

Das Bundesgesundheitsamt (OBIGER, 1972) prüfte 15 Bakterienstämme, darunter 7 *Subtilis*stämme, auf ihre Empfindlichkeit gegen 13 Antibiotika und Chemotherapeutika. *Bac. subtilis* BGA erwies sich am empfindlichsten und wird daher vom Bundesgesundheitsamt für den allgemeinen Hemmstofftest empfohlen.

SCHAAL und WENZEL (1972) verglichen 23 Testkeime, darunter 8 *Bac. subtilis*-Stämme, auf ihre Empfindlichkeit gegen Antibiotika und ihre Brauchbarkeit beim allgemeinen Hemmstofftest. Sie legten die minimale Hemmkonzentration von Antibiotika als absolute Empfindlichkeit der Testkeime zugrunde, da die Empfindlichkeit von Testkeimen nicht unbedingt durch den Vergleich einer bestimmten Antibiotika-Konzentration angezeigt wird. Folgende Keime wurden in dieser Arbeit für den mikrobiologischen Hemmstofftest empfohlen:

*Bac. subtilis* Bremen, *Bac. subtilis* 165, *Bac. subtilis* ATCC 6633 und *Bac. subtilis* BGA. Als Testkeim der Wahl erscheint den Autoren jedoch *Bac. subtilis* 165, da dieser Keim am empfindlichsten gegenüber Chloramphenicol und Bacitracin reagierte.

*Sarcina lutea* ATCC 9341 schließlich wurde von VAN SCHOTHORST (1970, 1971) zum Nachweis von Antibiotika beim sogenannten Nieren-Test benutzt. Der Autor empfiehlt bei diesem Test den Zusatz von Phosphaten zum Nährboden, um die Nachweisbarkeitsgrenze für Streptomycin zu senken. Streptomycin ist sonst noch lange nach therapeutischen Injektionen in der Niere nachweisbar, obwohl das Fleisch bereits frei davon ist.

## 2.2. Bacillus stearothermophilus als Testkeim zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis

In dem Bestreben, den Hemmstoffnachweis weiter zu vereinfachen und um vor allem schneller zu einer Aussage kommen zu können, wurde Bacillus stearothermophilus als Testkeim zum mikrobiologischen Hemmstoffnachweis eingesetzt.

Bac. stearothermophilus ist nach "Bergeys Manual of Determinative Bacteriology" (BREED, MURRAY und SMITH, 1957) eine Art der Familie 13 "Bacillaceae" mit folgenden biologischen Merkmalen: Stäbchen von 2,0 bis 5,0/ $\mu$  Länge und 0,6 bis 1,0/ $\mu$  Breite, beweglich, gram-labil, Sporen elliptisch, endständig bis halbendständig, Bouillon wird gleichmäßig getrübt, Wachstum in 3 %igem NaCl, Stärke wird hydrolysiert, aerob bis anaerob wachsend, Temperaturoptimum + 50 bis + 65°C, kein Wachstum bei + 28°C.

Zunächst fand dieser Keim, der sich durch besonders rasches Wachstum auszeichnet, nur Eingang bei der Milchuntersuchung.

GALESLOOT und LABOTS (1959) isolierten aus Milch einen Stamm von Bac. stearothermophilus, den sie wegen seiner Eigenschaft, Milch durch starke Säuerung schnell zu koagulieren, Bacillus calidolactis nannten.

GALESLOOT und HASSING (1962) beschreiben einen Schnelltest, bei dem Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953 als Testkeim dient. Nach 2 1/2 Stunden Bebrütung bei + 55°C waren Penicillinkonzentrationen von 0,0025 I.E./ml Milch festzustellen.

KRAACK und TOLLE (1967) benutzten ebenfalls Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953 für einen Mikrotiterschalentest zum Hemmstoffnachweis in Milch. Die Autoren beimpften Agar mit einer Bac. stearothermophilus-Suspension und bebrüteten 28 Stunden bei + 55°C. Anschließend wurde die gewachsene Kultur mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und zur Inaktivierung der vegetativen Keime 10 Minuten auf + 80°C erhitzt.

Mit dieser Suspension wurde ein auf + 55 bis 60°C erhitzter Agar so beimpft, daß eine Keimdichte von ca. 1,4 bis 1,5 x 10<sup>8</sup> Sporen/ml Agar entstand. Dem Agar-Sporen-Gemisch wurde Brillantschwarz als Wachstumsindikator zugesetzt. Nach einer Bebrütung von 2 1/2 Stunden bei + 55°C war das Ergebnis auf Grund der Farbreaktion abzulesen. Die für den Test präparierten Mikrotiterschalen konnten bis zu 21 Tagen bei + 2 bis 3°C bevorratet werden. Penicillin war mit diesem Test bis zu 0,006 I.E./ml, Dihydrostreptomycin bis 8 Gamma/ml und Chlortetracyclin-HCl bis 0,8 Gamma/ml sicher nachweisbar.

1969 wurde der gleiche Test von denselben Autoren verbessert. Sie verwendeten lyophilisierte Testkulturen und erhöhten die Testkeimkonzentration auf ca. 1,6 x 10<sup>8</sup> Keime/ml Agar; jetzt war nur noch eine Bebrütung von 2 Stunden bei Brutschranktemperaturen von + 68 bis 70°C nötig.

Die Nachweisgrenze mit diesem Test lag jedoch für Penicillin mit 0,007 bis 0,008 I.E./ml und für Streptomycin mit 10 Gramm/ml etwas höher als bei der Originalmethode.

Von TERPLAN und ZAADHOF (1969) wurden Schrägagar-Röhrchen mit Bac. stearoothermophilus var. calidolactis C 953 beimpft, und nach einer Bebrütung von 24 Stunden bei + 55°C die Kulturen mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Mit dieser Suspension wurde ein Agar-Keimgemisch von ca. 5 x 10<sup>6</sup> Keimen/ml Agar hergestellt. Bei hemmstoffhaltigen Milchproben waren bei diesem Agardiffusionstest Hemmhöfe nach 3 1/2 bis 4 Stunden Bebrütung bei + 68°C sichtbar. Vorbereitete Testgemische konnten bei Kühlschranklagerung bis 14 Tage bevorratet werden.

FORSCNER (1972) vermehrte Bac. stearoothermophilus var. calidolactis nicht mehr auf festen Nährböden, sondern in Hefeextrakt-Trypton-Dextrose-Bouillon, aus der er nach 6stündiger Bebrütung bei + 68°C den Testkeim mittels Zentrifugation gewann. Bis zur Herstellung der Testplatten wurden die Bazillen bei -20 bis 22°C auf-

bewahrt. Auch längere Lagerzeiten bei dieser Temperatur bewirkten keinen nennenswerten Abfall der Keimdichte.

Der gleiche Keim wurde von weiteren Autoren zum Hemmstoffnachweis in Milch teilweise mit verschiedenen Methoden (Agardiffusionstest ohne Indikator, Brillantschwarzreduktionstest und als TTC-Schnelltest) verwendet (KLEINSCHROTH und KRAACK, 1969; OBIGER, 1970; SCHRAUDY und RAUSCHER, 1972; TERPLAN, ZAADHOF und MATTHEIS, 1972).

FORSCHNER (1972) verglich bei Hemmstoffuntersuchungen in Milch Bac. stearothermophilus var. calidolactis und Bac. subtilis BGA. Bac. stearothermophilus wurde von FORSCHNER in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Keime/ml Agar benutzt, Bac. subtilis nach der Arbeitsanweisung des ALTS. Der erste Keim erwies sich als überlegen, er war empfindlicher gegen Antibiotika, besonders gegen Penicillin.

Verglichen wurde Bac. stearothermophilus var. calidolactis beim Hemmstoffnachweis in Milch außerdem noch mit Sarcina lutea und Joghurtkulturen von ZEITTRÄGER (1970) und BRUNN (1971).

Für Milch erwies sich Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953 bei allen Autoren als der am geeignetste Testkeim; seine Vorzüge sind:

1. Große Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, besonders Penicillin.
2. Durch die hohe Bebrütungstemperatur braucht die Milch vor Versuchsbeginn nicht mehr zur Ausschaltung originärer Hemmstoffe erhitzt zu werden.
3. Bakterielle Verunreinigungen des Nährbodens oder der Milch spielen auf Grund der hohen Bebrütungstemperatur keine Rolle mehr.
4. Das Ergebnis ist bereits nach 2 bis 3 Stunden ablesbar.

ZAADHOF (1971) verglich bei Milchuntersuchungen verschiedene Nährböden im Agardiffusionstest mit Bac. stearothermophilus var. calidolactis. DST (Diagnostic

Sensitivity Test)-Agar eignete sich am besten zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen. Dieses Medium zeichnet sich dadurch aus, daß die Hemmhöfe deutlich abgegrenzt waren und auch Sulfonamide nachweisbar waren. Letztere verursachten bei den anderen Nährmedien nicht immer deutliche Hemmzonen.

1973 untersuchte FORSCHNER u.a. folgende Faktoren des *Bac. stearothermophilus*-Hemmstofftestes in Verbindung mit Milchuntersuchungen:

1. Optimale Testkeimgewinnung
2. Schichtdicke des Testsystems
3. Keimdichte des Testsystems
4. Bebrütungszeit des Testsystems
5. Vordiffusion des Testsystems

Der Autor vermehrte den Testkeim in flüssigem Nährmedium (Bouillon) und auf festen Nährböden. Keimsuspensionen, die durch Abschwemmen von festen Nährböden gewonnen worden waren, wiesen einen wesentlich größeren Anteil versporteter Bazillen auf als Keimsuspensionen, die durch Zentrifugation aus Bouillon gewonnen wurden. Keime von Oberflächenkulturen erwiesen sich außerdem als wesentlich besser haltbar, da vegetative Keime offensichtlich nur beschränkt lagerfähig waren.

Empfohlen wird, den Schnelltest mit einer Keimdichte von  $10^5$ /ml Nährboden durchzuführen; es sind dann Bebrütungszeiten von 3 Stunden bei  $+ 70^{\circ}\text{C}$  bzw. 5 Stunden bei  $+ 60^{\circ}\text{C}$  bis zum Sichtbarwerden von Hemmhöfen nötig.

Zu den anderen Faktoren des *Bac. stearothermophilus*-Testes bemerkt FORSCHNER (1973) folgendes:

Die Schichtdicke des Testsystems ist von Bedeutung für die Empfindlichkeit des Testes. Je geringer nämlich die Höhe des Agar-Keimgemisches ist, desto breiter wird der Diffusionsbereich in horizontaler Richtung und folglich werden auch die Hemmhöfe größer. Unterschiedliche Keimdichten, wenn sie innerhalb zweier Zehnerpotenzen schwankten, hatten keinen Einfluß auf die Hemmhöfgröße mit definierten Hemmstoffmengen. Bebrütungszeiten von 3 Stunden bei  $+ 70^{\circ}\text{C}$  werden als optimal beschrieben, da in dieser Zeit ausreichend

Gelegenheit für die Hemmstoffe besteht, in den Agar zu diffundieren. Zeiten von 50 bis 60 Minuten ergaben deutliche Reduzierung der Hemmhofgröße. Das Agar-Keimgemisch war bei der letzten Bebrütungszeit vor dem eigentlichen Test zur Erlangung genügender Keimkonzentrationen vorbebrütet worden.

Eine Vordiffusion im Kühlschrank ergab keine definierbaren Unterschiede der Hemmhofgrößen.

Von KUNDRAT wurde 1968 erstmals Bac. stearothermophilus, und zwar ein bei der Saccharose-Fabrikation als Kontaminant aufgetretener Stamm, als Testkeim im Agardiffusionstest unter zusätzlicher Verwendung eines Indikators für den Nachweis von Hemmstoffen in Nieren von Schlachttieren benutzt.

Der Autor züchtete den Testkeim einmal in Bouillon (Standard I Nährbouillon Merck oder Glucose-Trypton-Bouillon) und zum anderen auf festen Nährböden, indem er obigen Nährmedien 2 % Agar zusetzte. Bebrütet wurde für 48 Stunden bei + 65°C. Aus der Bouillon waren die Kulturen mittels Zentrifugation zu gewinnen, von den festen Nährmedien durch Abschwemmen mit physiologischer NaCl-Lösung. Mit beiden Methoden konnten gleich gute Ausbeuten erzielt werden.

Zur Abtötung der vegetativen Formen wurden die Bazillen für 10 Minuten bei + 95°C gehalten und anschließend lyophilisiert. Mit diesem Sporenpulver wurde der Testagar beimpft und anschließend für 90 Minuten bei + 65°C bebrütet. Dieser noch flüssige Agar wurde dann in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren des Agars konnte der Test angesetzt werden. Die so vorbereiteten Platten waren bis zu einer Woche bei + 4°C vorrätig zu halten.

Beim eigentlichen Hemmstofftest belegte KUNDRAT (1968) dann das Testgemisch mit Filterpapierscheibchen, die vorher kurz in das eingeschnittene zu untersuchende Organ gelegt worden waren. Nach 50 Minuten Bebrütung bei + 65°C war der Test ablesbar, der Indikatorumschlag nach weiteren 70 Minuten. Bei hemmstoffhaltigen

Proben bildete sich um das Filterpapierscheibchen ein sichtbarer wachstumsfreier Hof, der durch einen Indikator verdeutlicht wurde.

1972 verkürzte derselbe Autor die Testzeit. Dem Nährboden (pH-Wert 7,0 bis 7,2) wurde bei + 65°C die *Bac. stearothermophilus*-Sporen beigemischt, so daß eine Sporendichte von  $5 \times 10^5$  /ml Agar entstand. Der so beimpfte Nährboden wurde in Petrischalen gefüllt und diese dann bei + 65°C für 135 Minuten bebrütet. Diese vorbebrüteten Testplatten konnten für den Schnelltest verwendet werden. Nach dem Belegen mit dem Untersuchungsmaterial waren nach erneuter Bebrütung für 45 Minuten bei hemmstoffhaltigen Proben Hemmhöfe sichtbar.

VAN SCHOTHORST (1970) verwendete ebenfalls *Bac. stearothermophilus* und zwar den Stamm C 953, zum Hemmstoffnachweis beim Schlachttier. Er benutzte aber Urin als Testmaterial, da *Bac. stearothermophilus* gegen natürliche keimhemmende Stoffe in der Niere empfindlich sein soll.

Dieser Test kann jedoch nur als "screening-Test" eingesetzt werden, da auf diese Weise auch Antibiotika nachgewiesen werden, welche den Tieren nutritiv verabreicht wurden. Bei einem positiven Resultat des Testes sind daher weitere Untersuchungen erforderlich; fällt der Test negativ aus, kann mit Sicherheit angenommen werden, daß im Fleisch der kontrollierten Tiere keine mikrobiologisch aktiven Rückstände vorkommen.

Der Test kam als Mikrotiterschalen-Test in Anlehnung an KRAACK und TOLLE (1967, 1969) zur Anwendung. Der Testkeim wurde durch 18stündige Bebrütung in Nährbouillon vermehrt. Das Agar-Keim-Gemisch des Testsystems besaß eine Dichte von ca.  $2,5 \times 10^5$  Keime/ml Agar. Nach 2 bis 3 Stunden Bebrütung bei + 60°C war das Ergebnis ablesbar.

VAN SCHOTHORST (1970) bestimmte die Nachweisgrenze dieses Urin-Schnell-Testes und verglich sie mit denen eines Nieren-Testes, der mit *Sarcina lutea* ATCC 9341 durchgeführt wurde. Penicillin war beim Urin-Test bis

0,02 I.E./ml und beim Nieren-Test bis zu 0,04 I.E./ml, Streptomycin bei ersterem bis 12 Gamma/ml bei letzterem bis 60 Gamma/ml und Chlortetracyclin bis 0,3 Gamma/ml bzw. 0,4 Gamma/ml nachweisbar.

EBRECHT und SEIFERT (1972) unternahmen Versuche mit Bac. stearo-thermophilus var. calidolactis bei Kaninchen, Mäusen und Rindern. Normales Blut der Tiere beeinflusste das Wachstum des Testkeimes immer depressiv, auch feuchte (blutige) Muskulatur verursachte unspezifische Hemmzonen. Die Autoren hielten bei ihren Untersuchungen die Leber als das geeignetste Organ, da sie keine unspezifischen Hemmzonen verursachte. Die Testzeit betrug 5 bis 6 Stunden.

SCHAAL und WENZEL (1972) hingegen lehnen Bac. stearo-thermophilus var. calidolactis als Testkeim ab, da er unter Versuchsbedingungen nur bei pH 6 ein auswertbares Wachstum zeigte. Für die Routineuntersuchungen von Fleisch ist jedoch nach Ansicht der Autoren der Doppelansatz bei pH 6 und 8 erforderlich (unterschiedliche pH-Optima der verschiedenen Antibiotika).

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß sich beim Hemmstoffnachweis in Milch Bac. stearo-thermophilus var. calidolactis C 953 bewährt hat und auch bei Routineuntersuchungen eingesetzt werden kann (KRAACK und TOLLE, 1967; TERPLAN und ZAADHOF, 1969; SCHRAUDY und RAUSCHER, 1972; FORSCHNER, 1972).

Dieser Keim wurde bisher versuchsweise auch bei Schlacht-tieruntersuchungen verwendet (VAN SCHOTHORST, 1970; KUNDRAT, 1972). Auffallend ist, daß bei KUNDRAT (1968, 1972) Bac. stearo-thermophilus auch für Nierenuntersuchungen mit Erfolg eingesetzt wurde, während VAN SCHOTHORST (1970) schreibt, daß Bac. stearo-thermophilus empfindlich gegen Lysozyme aus der Niere ist. Erwähnt werden muß hier, daß bei ASHTON und BUSTA (1968) 10 Bac. stearo-thermophilus-Stämme mit unterschiedlichem

Wachstum auf rohe Milch reagierten.

Bei der Methodik des Bac. *stearothermophilus*-Testes muß erwähnt werden, daß KUNDRAT (1968) sowohl auf festen Nährböden als auch in Bouillon den Testkeim gleich gut vermehren konnte, FORSCHNER (1973) hingegen in dem Verfahren auf festen Nährböden wesentliche Vorteile sieht.

Ebenso bestehen unterschiedliche Empfehlungen hinsichtlich der Keimeinsaat in den Testnährboden und der Bebrütungszeit bis zum Ablesen der Ergebnisse. Folgende Angaben werden gemacht:

KRAACK und TOLLE (1969) -  $1,6 \times 10^8$  Keime/ml Agar und 2 Stunden Bebrütung (bei Milchuntersuchungen)

TERPLAN und ZAADHOF (1969) -  $5 \times 10^6$  Keime/ml und 3 1/2 bis 4 Stunden Bebrütung (bei Milchuntersuchungen)

FORSCHNER (1973) -  $10^5$  Keime/ml Agar und 3 - 5 Stunden Bebrütung (bei Milchuntersuchungen)

VAN SCHOTHORST (1970) -  $2,5 \times 10^5$  Keime/ml Agar und 2 bis 3 Stunden Bebrütung (bei Harnuntersuchungen)

KUNDRAT (1972) -  $5 \times 10^5$  Sporen/ml Agar und zunächst 135 Minuten Vorbebrütung, dann 45 Minuten Bebrütung (bei Nierenuntersuchungen)

Um notwendige Massenschlachtetttieruntersuchungen durchführen zu können, müßte daher nach BARTELS et al. (1972) auf der Basis von Bac. *stearothermophilus* ein standardisierter Schnelltest erarbeitet werden.

Bei der Untersuchung von Schlachttieren hat sich bis jetzt Bac. subtilis gegenüber anderen Keimen als eindeutig überlegen gezeigt (PICHNARCIC et al., 1969; MEYER et al., 1969; BONFERT und BERRANG, 1969; GISSKE et al., 1970; WENZEL, 1971; OBIGER, 1972; SCHAAL und WENZEL, 1972).

Die relativ lange Testzeit von 18 Stunden beim Bac. *subtilis*-Agar-Diffusionstest ist gegenüber 2 bis 3 Stunden beim Bac. *stearothermophilus*-Milchtest jedoch von Nachteil.

### 2.3. Mikroorganismen zur Differenzierung von Hemmstoffen

Mit Hilfe verschiedener Mikroorganismen - sowohl antibiotikaresistenter als auch sensibler Keime - ist versucht worden, Hemmstoffe zu differenzieren. DRAGON (1958) benutzte eine Joghurtkultur (Streptococcus thermophilus und Thermobacterium bulgaricum) in Verbindung mit dem TTC-Verfahren nach NEAL und CALBERT (1956) und schloß an diese Methode den Gärungstest nach KLUYVER (1914) mit Saccharomyces cerevisiae an. Er konnte auf diese Art Antibiotika von Antiseptika in Milch unterscheiden.

TAKACS und KOVACS (1969) verwendeten Bac. subtilis, Staph. aureus, Sarc. lutea und E.coli. Die vier Keime waren unterschiedlich empfindlich gegen verschiedene Antibiotika. Durch die differierende Hemmung des Wachstums der vier Keime ließen sich Rückschlüsse auf die Art der vorhandenen Antibiotika ziehen.

VAN SCHOTHORST (1970) erstellte mit bestimmten Antibiotika Hemmzonenbilder bei Sarc. lutea, Bac. subtilis und Bac. cereus und verglich diese mit denen von fraglichen Proben. Bei Ähnlichkeit mit einem der Antibiotikabilder war dies ein qualitativer Nachweis des betreffenden Antibiotikums. Falls jedoch in der zu untersuchenden Probe eine Mischung von mehreren Antibiotika vorhanden ist, gelingt eine Identifizierung meistens nicht mehr, außer im Falle einer Mischung mit Penicillin, das sich mit Hilfe von Penicillase inaktivieren läßt.

### 3. Mikrobiologisch-chemisches Verfahren zum Antibiotikanachweis

Durch Kombination chemischer bzw. physiko-chemischer Verfahren mit mikrobiologischen Nachweismethoden ist

es gelungen, einen Antibiotikanachweis zu entwickeln, dem sowohl die Spezifität der Chemie zugrunde liegt, der aber auch die Breite der mikrobiologischen Nachweismethoden umfaßt.

Nach ROTH (1971) werden Agaroseplatten mit zu untersuchenden Fleischproben beschickt und die darin enthaltenen Antibiotika hochspannungselektrophoretisch getrennt. Anschließend wird die Platte mit einem Bakterienagargemisch überschichtet. Nach der Bebrütung bilden sich entsprechend den verschiedenen Antibiotika in unterschiedlicher Entfernung von der Auftragungslinie ovale Hemmhöfe aus.

Mit dieser Methode ist es möglich, Antibiotika qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

LANGNER, TEUFEL, SIEGERT und FROMMHOLD (1973) setzten als physiko-chemische Analysenmethoden die Dünnschichtchromatographie und die Niederspannungselektrophorese zur Antibiotikatrennung ein. Mit Hilfe letzterer konnten sie die Trennzeit auf 5 bis 45 Minuten verkürzen; ROTH (1971) benötigte mit der Hochspannungselektrophorese 2 Stunden.

Für die mikrobiologischen Teile der Verfahren wurden bei beiden Methoden Bac. subtilis-Sporen-Agargemische verwendet.

Die drei besprochenen Hemmstoffnachweisverfahren - chemisches bzw. physiko-chemisches, mikrobiologisches und mikrobiologisch-chemisches Verfahren - sind prinzipiell alle für Schlachttieruntersuchungen anwendbar. Chemische bzw. physiko-chemische Methoden arbeiten zwar sehr exakt, sind aber zu kosten- und zeitaufwendig und verlangen Speziallabors und eine lange methodische Einarbeitung. Für wissenschaftliche Grundlagenforschung bieten sie sich nach Auffassung von PICHNARCIK et al. (1969) zwar an, nicht jedoch für die Routinediagnostik.

Außerdem besitzen sie nach Meinung von LANGNER und TEUFEL (1972) eine geringere Empfindlichkeit als mikrobiologische Tests, die außerdem den Vorteil haben, einfacher, schneller und billiger als die physikochemischen Methoden zu sein (PICHNARCIK et al., 1969).

Von vielen Seiten wird jedoch Kritik am mikrobiologischen Hemmstoffnachweis bzw. allgemeinen Hemmstofftest (AH-Test) geübt. So zeigt dieser Test alle Stoffe an, die Bakterien im Wachstum hemmen, nicht aber spezifisch Antibiotika. Es läßt sich also keine Aussage über Art und Menge des Hemmstoffes machen (OBIGER, 1963). Diese Stoffe könnten aber auch physiologisch unbedenkliche Substanzen wie z.B. Fleischmilchsäure sein (VAN SCHOTHORST, 1969; LANGNER und TEUFEL, 1972). MANTEL (1971) und ROTH (1971) konnten jedoch zeigen, daß Fleischmilchsäure keinen Einfluß auf den AH-Test hat.

Weitere hemmende Stoffe könnten antibakteriell wirkende Substanzen in Pflanzen sein (KLIMA, 1966). WELZ (1967) widerlegte dies jedoch durch Fütterungsversuche bei Meerschweinchen.

SCHAAL (1961) weist auf mögliche unspezifische Eigenhemmungen durch Fäulnisprodukte im Fleisch hin. Dies wurde jedoch durch MEYER et al. (1969) sowie BECK und MANTEL (1972) widerlegt.

GEMMER, SEEGER und HAASE (1973) konnten nachweisen, daß Fleisch- und Nierenproben von Kälbern, die antibiotikafrei gefüttert wurden, im AH-Test immer ein negatives Ergebnis zeigten. In der Niere und Muskulatur des Schweines hingegen fanden sie hemmende Substanzen, die den Test beeinflussen können. Ihr Einfluß soll allerdings so gering sein, daß bei einer kritischen Bewertung keine falschpositiven Ergebnisse entstehen können. Um jegliche zweifelhaften Ergebnisse nicht als falschpositiv zu werten, sollte daher nach Ansicht der Autoren der Test erst dann als positiv gelten, wenn ein klarer Hemmhof von mindestens 2 mm das betreffende Organstück umgibt.

Im STAATSANZEIGER FÜR BADEN-WÜRTTEMBERG (1973) sind weitere Einwände am AH-Test zusammengestellt. Danach sollen die Ergebnisse der Untersuchungen von Proben gleicher Tiere durch mehrere Untersuchungsstellen stark voneinander abgewichen sein. Dazu wird ausgeführt, daß der AH-Test ein biologisches Verfahren ist, das in seiner Exaktheit von der Beachtung aller einzelnen Vorschriften abhängig ist. So ist es z.B. nötig, daß die Proben stets vom gleichen Personal angelegt und die Ergebnisse vom gleichen Personal abgelesen werden. Untersuchungsreihen vom Bundesgesundheitsamt haben dagegen zu keinem Fehlergebnis geführt. Ein weiteres Argument gegen den AH-Test ist, daß das Untersuchungsergebnis auch bei Kälbern, die nach der Vorschrift gefüttert worden sind, d.h. mit futtermittelrechtlich zugelassenen Antibiotika in nutritiven Dosen, zu einem positiven Ergebnis führen kann. SCHMIDT und WOLTERSDORF (1972) konnten dies in eigenen Versuchen nachweisen. BECK und MANTEL (1972) sowie GEMMER et al. (1973) kamen zu den gleichen Ergebnissen. Letztere Autoren betonen jedoch auch gleichzeitig, daß diese Ergebnisse nicht gegen den AH-Test sprechen. Sie meinen, daß es sich bei den zur Zeit üblichen Mastmethoden, d.h. verlängerter Mastzeit auf 12 Wochen mit Endgewichten von 150 kg und damit verbundener größerer Aufnahme von Antibiotika im Milchaustauschfutter nicht mehr um nutritive Antibiotikamengen handelt. Ein Kalb nimmt in der Endmast täglich zwischen 2,5 bis 3,0 kg Milchaustauschfutter auf. Entsprechend der Normentafel A sind durchschnittlich 100 bis 120 mg Tetracycline je kg Milchaustauschfutter zugemischt. Ein Kalb nimmt somit täglich zwischen 250 bis 360 mg Tetracycline auf. Verglichen mit von Arzneimittelfirmen empfohlenen therapeutischen Dosen handelt es sich dabei nicht mehr um nutritive, sondern bestenfalls um prophylaktische Mengen. Der positive Ausfall des AH-Testes ist somit erklärbar. Die Autoren empfehlen Absetzfristen der betreffenden

Milchaustauschfutter vor der Schlachtung, da dann der Test negativ ausfällt oder Reduzierung der gegenwärtig im Futter zugelassenen Antibiotikahöchstmengen von 80 - 120 ppm auf 20 - 50 ppm.

Die Kritik, daß der Test auf eine Reihe von Antibiotika nicht anspreche, besonders auf Chloramphenicol und Erythromycin (THIER, 1972), konnte ebenfalls von BECK und MANTEL (1972) entkräftet werden. Der negative Ausfall des AH-Testes ist mit den besonderen Resorptionsverhältnissen dieser Arzneimittel zu erklären, da sie schon nach wenigen Stunden aus dem Organismus wieder ausgeschieden werden.

Als entscheidendes Argument gegen den AH-Test bleibt bestehen, daß keine Aussage über die Art und Menge des Antibiotikums bzw. Chemotherapeutikums zu machen ist. VAN SCHOTHORST (1970) versuchte, diese Lücke durch Verwendung verschiedener Testkeime zu schließen. Hierdurch wurde eine qualitative Aussage über die Art des Hemmstoffes möglich. Bei Proben, die verschiedene Antibiotika enthalten, versagt diese Methode jedoch.

Der chemisch-mikrobiologische Test kann die hier bestehende Lücke ausfüllen, da er die Exaktheit der chemischen Methode mit der hohen Empfindlichkeit des mikrobiologischen Testes vereint. Allerdings bedarf es bei diesem Test eines bedeutend größeren Zeit-, Arbeits- und Materialaufwandes. Der AH-Test ist daher dank seiner Einfachheit geeignet, Fortschritte auf dem Wege zu einem rückstandsfreien Lebensmittel zu erzielen (LANGNER et al., 1973).

## C Eigene Untersuchungen

In eigenen Untersuchungen sollte ein standardisiertes Verfahren zum Hemmstoffnachweis unter Verwendung des *Bacillus stearothermophilus* erarbeitet werden. Der Nachweis von Hemmstoffen sollte in Niere, Leber und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen unter gleichzeitiger Verwendung des *Bacillus stearothermophilus* (Stamm C 953) und des *Bacillus subtilis* (Stamm BGA) geführt werden. Außerdem sollten hemmstofffreie Nieren und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen mit beiden Keimen verglichen werden.

Für den Hemmstoffnachweis mit Hilfe des *Bac. stearothermophilus* sollten folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- a) Verschiedene Schichtdicke der Nährböden bei konstanter Bakterieneinsaat
- b) Verschiedene pH-Werte (6,0, 7,0 und 8,0)
- c) Verschiedene Bakterienkonzentrationen bei gleichbleibender Agarschichtdicke
- d) Direkte Bebrütung des Materials
- e) Bebrütung des Materials nach Vordiffusion

## I Material

1. Für die Untersuchung wurden folgende *Bacillus*arten verwendet:

- a) *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953  
Der Testkeim stammte aus einem Brillantschwarz-reduktions (BR)-Testtablett der Firma Laboratorium Enterotox, Kempen. Die Firma bezeichnete als Herkunft des Stammes Dr. Galesloot, Dr. Hassing, Nizo, Ede/Niederlande.
- b) *Bacillus subtilis* BGA  
In regelmäßigen Abständen wurde eine Sporensuspension dieses Stammes vom Robert von Ostertag-Institut des Bundesgesundheitsamtes bezogen.

2. An Nährböden wurden verwendet:

a) Agar folgender Rezeptur:

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| Pepton                           | 50,0 |
| Fleischextrakt                   | 40,0 |
| Agar rein                        | 60,0 |
| NaCl                             | 25,0 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10,0 |
| auf 5000 ml Aqua dest.           |      |

b) Nährbouillon folgender Rezeptur:

|                        |      |
|------------------------|------|
| Hefeextrakt Merck 3753 | 10,0 |
| Trypton Oxoid L 42     | 20,0 |
| Dextrose               | 0,5  |
| auf 1000 ml Aqua dest. |      |

c) DST-Agar der Firma Oxoid

d) Standard II-Nähragar Merck

Die pH-Werteinstellung der Nährböden erfolgte mit HCl bzw. NaOH. Zur Messung wurde ein pH-Messgerät Metrohm E 350 B benutzt.

### 3. Brillantschwarzreduktions (BR) - Teströhrchen

Von der Firma Enterotox Kempen standen BR-Teströhrchen zur Verfügung. Jedes Röhrchen enthielt 0,15 ml Testgemisch, bestehend aus Agar, Endosporen von Bac. stearothermophilus und Brillantschwarz als Indikator.

### 4. Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern und Muskulatur

Untersucht wurden Niere, Leber und Muskulatur von 179 not- bzw. krankgeschlachteten Tieren (Rinder, Kälber und Schweine), die am Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung aufgrund hemmstoffpositiver Nieren aufgefallen waren.

### 5. Hemmstofffreie Nieren

Die Nieren stammten von 10 Kälbern, 70 Rindern und 70 Schweinen aus Normalschlachtungen des Schlachthofes Heidelberg, die im BGA-Test hemmstoffnegativ waren.

#### 6. Hemmstofffreie Muskulatur

Die Muskulatur stammte von not- bzw. krankgeschlachteten Tieren. Zur Untersuchung kamen 50 Proben von Rindern, 30 Proben von Kälbern und 40 Proben von Schweinen, die am Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg als hemmstoffnegativ ermittelt worden waren.

#### 7. Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen

In die Untersuchungen wurden folgende Substanzen einbezogen:

Penicillin G, Streptomycin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Chloramphenicol, Neomycin, Furazolidon und Sulfa-furazol.

### II Methodik

#### 1. Herstellung der Bazillen- bzw. Sporensuspensionen

##### a) Bac. stearothermophilus-Suspension

Zur Vermehrung dieses Testkeimes wurde von den beiden Möglichkeiten - Züchtung in Bouillon bzw. auf festen Nährböden (KUNDRAT, 1968) - der Züchtung in Bouillon aus arbeitstechnischen Gründen der Vorzug gegeben. Diese Methode war einfacher und schneller durchführbar.

Die Rezeptur der Bouillon erfolgte in Anlehnung an TERPLAN und ZAADHOF (1969).

Kolleschalen (G 20 Firma Schott) mit 250 ml Hefeextrakt-Trypton-Dextrose-Bouillon wurden mit Bac. stearothermophilus-Suspension beimpft und 16 Stunden bei + 63 bis 65°C bebrütet und dabei mehrmals, zwecks besserer Sauerstoffversorgung, geschüttelt. Anschließend wurde die Bouillon 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert, mit dem Bodensatz frische Bouillon in Kolleschalen beimpft, 8 Stunden bei + 63 bis 65°C bebrütet und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment wurde mit physiolog. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit

sterilen Glasperlen 30 Minuten geschüttelt.

Die Keimzahlbestimmung der Bazillen-Suspension erfolgte auf Pepton-Fleischextrakt-Agar im Oberflächenverfahren (Spatelverfahren).

Ein Teil der Suspension wurde zum Abtöten der vegetativen Formen 10 Minuten in ein Wasserbad von  $+ 95^{\circ}\text{C}$  gebracht und anschließend die Keimzahl bestimmt. Ein weiterer Teil der Suspension wurde bei  $- 20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### b) Bac. subtilis-Sporensuspension

Bac. subtilis wurde nach der Arbeitsanweisung des "Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" (ALTS) zum Hemmstoffnachweis benutzt.

Kolleschalen (G 20 Firma Schott) wurden mit 250 ml Pepton-Fleischextrakt-Agar beschickt, der erkaltete Agar anschließend mit Bac. subtilis-Sporensuspension beimpft und 10 Tage bei  $+ 30^{\circ}\text{C}$  bebrütet, bis die Versporung eingetreten war. Die Abschwemmung der Sporen erfolgte mit steriler physiolog. NaCl-Lösung. Die so erhaltene Suspension wurde 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Sediment in steriler physiolog. NaCl-Lösung aufgenommen und abermals 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde zum Sediment sterile physiolog. NaCl-Lösung zugegeben und 30 Minuten bei  $+ 70^{\circ}\text{C}$  zur Abtötung der vegetativen Formen erhitzt. Die so gewonnene Sporensuspension wurde auf eine Dichte von  $10^7$  Sporen/ml eingestellt.

## 2. Herstellung der Bazillen- bzw. Sporen-Agarnährböden

#### a) Bac. stearothermophilus-Agarnährböden

Als Nährboden diente DST-Agar Oxid, da dieser sich nach ZAADHOF (1971) bei Bac. stearothermophilus als Testkeim am besten für den Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen eignet.

Der pH-Wert wurde auf 6,4; 7,5 und 8,4 bei + 20°C eingestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf + 65°C betrugen die pH-Werte 6,0; 7,0 und 8,0. Bei + 60°C wurde dem Agar unter Schütteln die Bac. stearothermophilus-Suspension zugegeben, anschließend das Gemisch in Petrischalen so pipettiert, daß Agarschichthöhen von 2 mm und 1 mm entstanden. Die Keimdichte wurde auf  $10^5$ /ml Agar,  $10^6$ /ml Agar und  $10^7$ /ml Agar eingestellt; die fertigen Platten in den Kühlschrank bei + 2°C verbracht.

b) Bac. subtilis-Agarnährböden

Als Nährboden diente Standard II-Nähragar Merck mit pH-Werten von 6,0; 7,0 und 8,0. Dieser Nährboden wird in der Arbeitsanweisung des ALTS empfohlen.

Lediglich bei den hemmstofffreien Nieren wurde Bac. subtilis mit DST-Agar Oxoid verwendet, um hier möglichst gleiche Bedingungen wie beim Bac. stearothermophilus-Test zu erhalten.

Zu 500 ml verflüssigtem und auf + 50°C abgekühltem Agar wurden 0,5 ml der Ausgangssporensuspension von Bac. subtilis unter Schütteln zugefügt, so daß eine Keimdichte von  $10^4$  Sporen/ml Agar entstand; anschließend wurde der so beimpfte Agar in Petrischalen auf eine Agarschichtdicke von 2 mm pipettiert.

3. Vergleich von Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953 mit Bac. subtilis BGA

Testplatten beider Keime wurden parallel mit Material belegt und anschließend gleich bebrütet.

Die Bac. stearothermophilus-Platten ( $10^6$  Keime/ml Agar) wurden 3 bis 4 Stunden bei + 63 bis 65°C bebrütet. Die Bac. subtilis-Platten ( $10^4$  Sporen/ml Agar) wurden mindestens 18 Stunden bei + 30°C bebrütet. Bei beiden Keimen wurde in Anlehnung an PICHNARCIK et al. (1969) eine Agarschichtdicke von 2 mm gewählt.

a) Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen

Die Empfindlichkeit der beiden Teststämme wurde gegenüber folgenden Antibiotika- und Chemotherapeutikamengen überprüft:

Penicillin 1,5 I.E., Streptomycin 10  $\mu$ g (Mikrogramm), Chlortetracyclin 10  $\mu$ g, Oxytetracyclin 10  $\mu$ g, Chloramphenicol 10  $\mu$ g, Neomycin 10  $\mu$ g, Furazolidon 50  $\mu$ g und Sulfa-furazol 100  $\mu$ g.

Filterpapierblättchen mit den verschiedenen Substanzen wurden auf das Bakterien-Agargemisch gelegt und die Hemmhöfe nach der Bebrütung ausgemessen.

b) Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen

Aus bei -20°C tiefgefrorenen Organen wurden mittels eines Korkbohrers Zylinder mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm gestanzt und auf das Testgemisch gelegt (Gefrierblockverfahren nach FORSCHNER, 1962).

c) Hemmstofffreie Nieren von Rindern, Kälbern und Schweinen

Die hemmstofffreien Nieren wurden sowohl nach dem Gefrierblockverfahren untersucht als auch nach der Blättchenmethode von KUNDRAT (1968, 1972).

Bei dem Blättchenverfahren wurden in das eingeschnittene Organ Filterpapierblättchen mit einem Durchmesser von 6 mm (Firma Carl Schleicher und Schüll, Best. Nr. 2668) gesteckt und diese - nachdem sie sich mit Orgensaft vollgesogen hatten - auf das Testgemisch gelegt.

d) Hemmstofffreie Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen

Zur Anwendung kam das Gefrierblockverfahren.

4. Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953

Mit diesem Keim wurden folgende Faktoren überprüft:

a) Haltbarkeit der Suspension

Gelagert wurde die Bakteriensuspension bei + 2°C und bei - 20°C.

b) Verschiedene Agarschichtdicke des Testesystems

Bei konstanter Keimzahl von  $10^6$ /ml Agar wurden Agarschichtdicken von 2 mm und 1 mm verglichen.

2 mm wurde aufgrund der in der Literatur gemachten Empfehlung (PICHNARCIK et al. 1969) gewählt, 1 mm um den Test eventuell empfindlicher zu machen.

c) Verschiedene Keimkonzentrationen im Agar

Es wurden die Bebrütungszeiten bis zum Sichtbarwerden von Hemmzonen und die Hemmstoffempfindlichkeit bei  $10^5$  Keime/ml Agar,  $10^6$  Keime/ml Agar und  $10^7$  Keime/ml Agar bei einer einheitlichen Agarschichtdicke von 2 mm festgestellt.

d) Verschiedene pH-Werte

Verglichen wurden pH 6,0; 7,0 und 8,0

e) Vordiffusion

Ein Teil der Versuchsplatten kam vor der Bebrütung bei + 63 bis 65°C eine Stunde in den Kühlschrank zur Vordiffusion.

f) Brillantschwarzreduktions (BR) - Teströhrchen

Die BR-Teströhrchen der Firma Enterotox wurden wie folgt mit dem zu untersuchenden Material beschickt:

1. Ein gefrorener Organzylinder (5 mm Ø, 3 mm Höhe) wurde direkt auf das Versuchsgemisch gegeben und anschließend bei + 63 bis 65°C bebrütet bzw. zuerst eine Stunde bei + 2°C aufbewahrt und dann erst bebrütet.
2. Ein gefrorener Organzylinder (5 mm Ø, 3 mm Höhe) wurde auf das Versuchsgemisch gelegt und eine Stunde bei + 2°C zur Diffusion aufbewahrt, anschließend entfernt und jetzt erst das Testgemisch bei + 63 bis 65°C bebrütet.
3. In ein aufgetautes bzw. frisches Organstück wurde ein Schnitt gelegt, ein Filterblättchen (Ø 6 mm) hineingesteckt und dieses, nachdem es sich mit

Organsaft vollgesogen hatte, auf das Versuchsgemisch der BR-Teströhrchen verbracht. Die Bebrütung erfolgte einmal direkt bei + 63 bis 65°C, zum anderen nach einer Vordiffusion von einer Stunde bei + 2°C.

## 5. Auswertung

Das Ausmessen der runden sichtbaren wachstumsfreien Zonen im Testgemisch erfolgte nach der Bebrütung mit einer Schublehre in Millimetern. Bei jedem Organ wurde das arithmetische Mittel von mehreren Stücken genommen (pro Organ bis zu sechs Proben). Gemessen wurde der Abstand von wachstumsfreier Zone bis zum Organrand, der bei den Platten, die bei + 63 bis 65°C mit *Bac. steaerothermophilus* bebrütet worden waren, häufig in zwei Zonen aufzuteilen war, da bei dieser hohen Temperatur das Organstück oft stark zerfloß (Abb. 1 a). Auf den bei + 30°C mit *Bac. subtilis* bebrüteten Platten zerfloß das Organstück nicht (Abb. 1 b).

Als hemmstoffpositiv wurden in Anlehnung an den ALTS Hemmzonen von mindestens 1 mm gewertet.

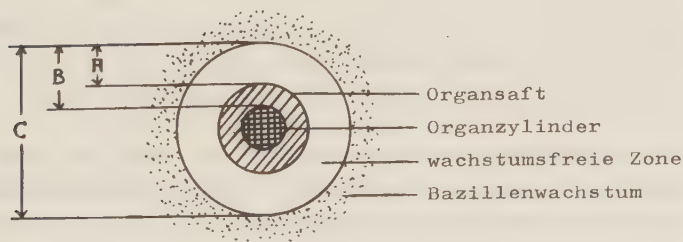


Abb: 1 a

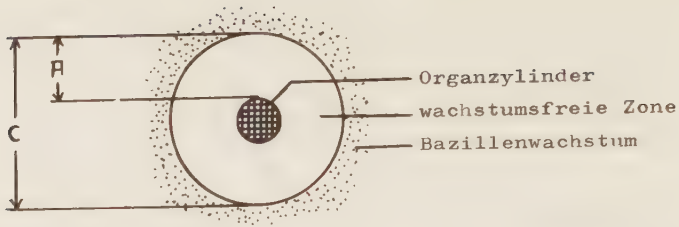


Abb.: 1 b

Legende zu Abb. 1 a und b:

- A = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum äußersten Rand der Organprobe bzw. bei zerlaufenen Stücken (Abb. 1 a) bis zum Organsaft (Hemmzone)
- B = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum festen Organstück
- C = Durchmesser der gesamten wachstumsfreien Zone (Hemmhofdurchmesser)

Aus den Hemmhöfen von *Bac. stearrowthermophilus* und *Bac. subtilis* wurden für jedes Organ und jede Tierart die arithmetischen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) errechnet. Die Frage, ob sich diese Mittelwerte in statistisch gesichertem Ausmaß voneinander unterscheiden, ob also die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten signifikant ist, wurde mit Hilfe des t-Testes nach STUDENT geklärt.

Dazu wurde für *Bac. stearrowthermophilus* und *Bac. subtilis* bei jedem Organ und jeder Tierart nach folgender Formel die Varianz berechnet:

$$s^2 = \frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n - 1}$$

Aus den Varianzen ( $S_x^2$  und  $S_y^2$ ) ergab sich nach folgender Formel der Fehler der Differenz ( $S_D$ ):

$$S_D = \sqrt{\frac{S_x^2}{n_x} + \frac{S_y^2}{n_y}}$$

Mit Hilfe des t-Wertes

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{S_D}$$

wurde geprüft, ob bei der gegebenen Zahl an Freiheitsgraden

$$FG = n_x + n_y - 2$$

eine statistische Sicherung gegeben ist.

Die Irrtums- oder Überschreitungsmöglichkeit liegt unter 5 %, was unter Berücksichtigung der biologischen Streubreite ausreichend ist.

Bei den BR-Teströhrchen der Firma Enterotox wurde an Hand des Farbumschlages das Ergebnis des Hemmstoffnachweises abgelesen.

Das unbebrütete Testgemisch hatte eine dunkelblaue Farbe, die, wenn das Brillantschwarz nicht reduziert wurde (kein Wachstum des Testkeimes), beibehalten wurde. Proben, bei denen das Testgemisch die Ausgangsfarbe beibehielt oder aber die Farbe heller wurde, aber noch deutlich blau war, galten als positiv. Eine braune Farbe des Testgemisches mit bläulicher Oberfläche wurde als zweifelhaft beurteilt. War das Testgemisch braun oder gelb nach der Bebrütung geworden, galt die Probe als negativ.

### III Ergebnisse

#### 1. Herstellung der Bac. stearothermophilus-Suspension

Bei der Herstellung der Bac. stearothermophilus-Suspension konnte in Hefeextrakt-Trypton-Dextrose-Bouillon eine Keimdicke bis zu  $10^8$  Keime/ml erreicht werden. Meist wurden jedoch nur Keimzahlen von 1 bis  $3 \times 10^7$ /ml erzielt.

Nach dem Erhitzen der Bazillen-Suspension auf  $95^\circ\text{C}$  (zur Gewinnung einer Sporensuspension) blieben von der Ausgangssuspension nur ca. 0,2 % der Keime am Leben. Da diese niedrigen Sporendichten nicht für einen Schnelltest ausreichten, wurde bei den Versuchen nur noch mit den vegetativen Formen gearbeitet.

#### 2. Vergleich von Bac. stearothermophilus var. calidolactis mit Bac. subtilis BGA

##### a) Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen

Bei der Feststellung und dem Vergleich der Empfindlichkeit von Bac. subtilis und Bac. stearothermophilus gegen verschiedene Antibiotika- und Chemotherapeutika wurden Platten mit einer Agar-Schichthöhe von 2 mm und einer Keimzahl von  $10^6$  bei Bac. stearothermophilus (3 Std. bebrütet) und  $10^4$  Keime/ml Agar bei Bac. subtilis (18 Std. bebrütet) verwendet; gleichzeitig wurde die Hemmung bei pH 6,0; 7,0 und 8,0 verglichen. Gemessen wurde der Abstand vom Filterpapierrand bis zum wachstumsfreien Rand in Millimetern (Tabelle 1).

Bei Bac. stearothermophilus wurde das arithmetische Mittel mehrerer Hemmzonen verschiedener Platten genommen, da trotz annähernd gleicher Bakterieneinsaat und gleichem Antibiotikum leichte Unterschiede in der Hemmhofgröße feststellbar waren.

Tabelle 1: Hemmwirkung von Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen auf *Bac. stearothermophilus* und *Bac. subtilis* BGA

| Substanz                    | Bac. stearotherm. |      |      | Bac. subtilis |      |      |
|-----------------------------|-------------------|------|------|---------------|------|------|
|                             | pH 6              | pH 7 | pH 8 | pH 6          | pH 7 | pH 8 |
| Penicillin 1.5 I.E.         | 12,5              | 13   | 13,5 | 12            | 11   | 11   |
| Streptomycin 10 $\mu$ g     | 3,5               | 6    | 7    | 6             | 10   | 11   |
| Chlortetracyclin 10 $\mu$ g | 9                 | 5    | 4    | 9             | 8    | 5    |
| Oxytetracyclin 10 $\mu$ g   | 7                 | 5,5  | 5,5  | 7             | 7,0  | 5,0  |
| Chloramphenicol 10 $\mu$ g  | 5                 | 5    | 5    | 9             | 9    | 9    |
| Neomycin 10 $\mu$ g         | 5                 | 6,5  | 9    | 5             | 9    | 13   |
| Furazolidon 50 $\mu$ g      | 6,5               | 8    | 8    | 13            | 14   | 14   |
| Sulfa-furazol 100 $\mu$ g   | r                 | r    | r    | 13            | 11   | 10   |

Zeichenerklärung:

Zahl = Hemmzone in mm

r = resistent, Wachstum des Testkeimes wurde nicht beeinflusst

Gegen Streptomycin, Chloramphenicol, Neomycin und Furazolidon war *Bac. subtilis* empfindlicher als *Bac. stearothermophilus*, gegen Penicillin jedoch *Bac. stearothermophilus*. Chlortetracyclin und Oxytetracyclin verursachten bei *Bac. subtilis* und *Bac. stearothermophilus* im pH 6-Bereich die gleiche Hemmung. Gegen Sulfa-furazol war *Bac. stearothermophilus* resistent; das Wachstum wurde durch diese Substanz nicht gehemmt.

b) Hemmstoffhaltige Nieren, Lebern und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen

In den Tabellen 2 bis 8 sind die Hemmhofgrößen von hemmstoffpositiven Nieren, Lebern und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen bei *Bac. stearrowthermophilus* (Agarschichthöhe 2 mm) und *Bac. subtilis* (Agarschichthöhe 2 mm) verglichen worden. In der zweiten Rubrik sind zusätzlich die Werte für eine Agarschichthöhe von 1 mm bei *Bac. stearrowthermophilus* aufgeführt.

Wie in Abb. 1 a und 1 b erklärt, bedeuten:

- A = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum äußersten Rand der Organprobe bzw. bei zerlaufenen Stücken bis zum Organsaft in mm (Hemmzone)
- B = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum festen Organstück in mm
- C = Durchmesser der gesamten wachstumsfreien Zone in mm (Hemmhofdurchmesser)

Die *Bac. subtilis*-Platten wurden für mindestens 18 Stunden bei + 30°C bebrütet. Die *Bac. stearrowthermophilus*-Platten wurden zu Beginn der Versuchswoche 3 Stunden bei + 63 bis 65°C und gegen Ende der Woche 4 Stunden bei + 63 bis 65°C bebrütet, da ab dem 4. Tag nicht immer nach 3 Stunden deutliche Hemmhöfe ablesbar waren (die Platten mit dem Testgemisch wurden zu Beginn der Woche hergestellt und bei + 2°C gelagert).

*Bac. stearrowthermophilus* wurde in einer Keimdichte von  $10^6$  Keime/ml Agar, *Bac. subtilis* in einer Sporendichte von  $10^4$  Sporen/ml Agar benutzt.

In den Tabellen 2 bis 4 sind die Hemmhöfe hemmstoffpositiver Nieren von 48 Rindern (Tabelle 2), 41 Kälbern (Tabelle 3) und 38 Schweinen (Tabelle 4) bei *Bac. stearrowthermophilus* und *Bac. subtilis* aufgeführt.

Tabelle 2: Hemmstoffpositive Nieren von Rindern (in die Tabelle ist die jeweils größte Hemmfläche in mm bei pH 6,0; 7,0 oder 8,0 aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |      |      |                           |     |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|------|------|---------------------------|-----|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |      |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B    | C    | A                         | B   | C    | A                         | C  |
| 1            | 9                         | 11   | 27   | 10                        | 12  | 30   | 7,5                       | 20 |
| 2            | 3,5                       | 5,5  | 15   | 6,5                       | 8,5 | 22   | 3                         | 11 |
| 3            | 1,5                       | 3,5  | 12,5 | 2                         | 4   | 15   | 3                         | 11 |
| 4            | 5                         | 7    | 20   | 7                         | 9   | 23   | 2                         | 9  |
| 5            | 1,5                       | 3    | 11,5 | 2,5                       | 4   | 13   | 3                         | 11 |
| 6            | 5                         | 7    | 18   | 6                         | 7,5 | 19   | 6,5                       | 18 |
| 7            | 5                         | 8,5  | 20   | 5,5                       | 0   | 20,5 | 7                         | 19 |
| 8            | 11                        | 13   | 30   | 11                        | 13  | 31   | 11                        | 27 |
| 9            | 3                         | 5    | 15   | 3,5                       | 6   | 17   | 5                         | 15 |
| 10           | 7                         | 8    | 19   | 7,5                       | 8,5 | 20   | 7                         | 19 |
| 11           | 2,5                       | 4    | 14   | ./.                       | ./. | ./.  | 2,5                       | 10 |
| 12           | 0,5                       | 0    | 7    | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |
| 13           | 8                         | 0    | 26   | 10                        | 0   | 29   | 7                         | 19 |
| 14           | 1,5                       | 2    | 9    | 2                         | 0   | 11   | 1                         | 7  |
| 15           | 9                         | 0    | 27   | 10                        | 0   | 30   | 6                         | 17 |
| 16           | 12                        | 13   | 33   | 13                        | 15  | 35   | 9                         | 23 |
| 17           | 5                         | 0    | 15   | 5                         | 0   | 15   | 6                         | 17 |
| 18           | -                         | -    | -    | 1                         | 4   | 14   | 1                         | 7  |
| 19           | 5                         | 8    | 25   | ./.                       | ./. | ./.  | 4,5                       | 14 |
| 20           | 9                         | 10   | 25   | ./.                       | ./. | ./.  | 8                         | 21 |
| 21           | 2                         | 4    | 15   | 3                         | 0   | 17   | 6,5                       | 18 |
| 22           | 8                         | 10   | 24   | 9                         | 11  | 26   | 7,5                       | 20 |
| 23           | 5                         | 7    | 18,5 | 6                         | 8   | 20   | 7                         | 19 |
| 24           | 8                         | 10   | 24   | 10                        | 12  | 28   | 10                        | 25 |
| 25           | 2,5                       | 4    | 13   | 2,5                       | 5   | 14   | 1                         | 7  |
| 26           | 3                         | 4    | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | 3                         | 11 |
| 27           | 10                        | 12   | 28   | ./.                       | ./. | ./.  | 9                         | 23 |
| 28           | 7                         | 8,5  | 23   | ./.                       | ./. | ./.  | 8                         | 21 |
| 29           | 10                        | 13   | 28   | ./.                       | ./. | ./.  | 8                         | 21 |
| 30           | 9,5                       | 13,5 | 29,5 | ./.                       | ./. | ./.  | 8                         | 21 |

Fortsetzung von Tabelle 2:

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |     |      |                           |      |     | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|------|---------------------------|------|-----|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |      |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C    | A                         | B    | C   | A                         | C  |
| 31           | 1                         | 4   | 14   | 1,5                       | 4,5  | 14  | 3                         | 11 |
| 32           | 9                         | 10  | 25   | 10                        | 13   | 27  | 7,5                       | 20 |
| 33           | 7,5                       | 0   | 20   | 8                         | 0    | 21  | 7,5                       | 20 |
| 34           | 4                         | 0   | 13   | ./.                       | ./.  | ./. | 7                         | 19 |
| 35           | 6                         | 0   | 20   | ./.                       | ./.  | ./. | 6                         | 17 |
| 36           | 0,5                       | 0   | 7    | 9                         | 0    | 24  | 4                         | 13 |
| 37           | 9                         | 10  | 25   | 10                        | 12   | 29  | 10                        | 25 |
| 38           | 8                         | 11  | 25,5 | 9,5                       | 11,5 | 27  | 7,5                       | 20 |
| 39           | 2                         | 3   | 12   | 4                         | 6    | 16  | 1                         | 7  |
| 40           | 3                         | 0   | 15   | 4                         | 6    | 17  | 1                         | 7  |
| 41           | 4                         | 6,5 | 17   | 5,5                       | 8    | 20  | 3,5                       | 12 |
| 42           | 9                         | 11  | 26   | 10,5                      | 12,5 | 30  | 10                        | 25 |
| 43           | 2                         | 4   | 12   | 3,5                       | 6    | 17  | 1                         | 7  |
| 44           | 5                         | 6   | 16,5 | 5,5                       | 7    | 19  | 5,5                       | 16 |
| 45           | 11                        | 12  | 30   | 12                        | 14   | 33  | 9                         | 23 |
| 46           | 2                         | 4   | 13   | 3                         | 5    | 15  | 5                         | 15 |
| 47           | 3                         | 6   | 17   | 4                         | 7    | 18  | 3                         | 11 |
| 48           | 8                         | 10  | 23   | 9                         | 11   | 25  | 7,5                       | 20 |

Zeichenerklärung für die Tabellen 2 bis 8:

- = Wachstum nicht beeinflusst
- o = nicht meßbar, da Grenze zwischen Organsaft und Organzylinder undeutlich
- ./. = nicht durchgeführt

Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß von 48 Rindernieren bei einer Agarschichthöhe von 2 mm 45 Proben mit Bac. stearothermophilus als hemmstoffpositiv ermittelt wurden, da sie Hemmzonen von mindestens 1 mm verursacht hatten. Drei Proben (Nr. 12, 18, 36) mußten als hemmstoffnegativ beurteilt werden, da keine Hemmzonen oder nur solche von 0,5 mm vorhanden waren. Dagegen waren bei Bac. subtilis alle 48 Nierenproben hemmstoffpositiv. Überein-

stimmung in der Aussage "hemmstoffpositiv" bestand bei den beiden Testkeimen folglich bei 45 der 48 untersuchten Rindernieren.

Tabelle 3: Hemmstoffpositive Nieren von Kälbern (in die Tabelle ist die jeweils größte Hemmfläche in mm bei pH 6,0; 7,0 oder 8,0 aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |      |      |                           |     |     | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|------|------|---------------------------|-----|-----|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |      |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B    | C    | A                         | B   | C   | A                         | C  |
| 1            | 1                         | 3    | 11   | 1,5                       | 4   | 13  | 1                         | 7  |
| 2            | 3                         | 5    | 19   | 6                         | o   | 21  | 6,5                       | 18 |
| 3            | 5                         | 7    | 17   | 5                         | 6   | 19  | 6,5                       | 18 |
| 4            | 1                         | 3    | 11   | ./.                       | ./. | ./. | 1                         | 7  |
| 5            | 2,5                       | 5    | 14   | 3,5                       | 6   | 16  | 1                         | 7  |
| 6            | 1                         | o    | 8    | 1                         | 2   | 12  | 1                         | 7  |
| 7            | 9                         | 11,5 | 26   | 1o                        | 12  | 28  | 9,5                       | 24 |
| 8            | 14                        | 16   | 35   | ./.                       | ./. | ./. | 1o                        | 25 |
| 9            | 1o                        | 11   | 27   | ./.                       | ./. | ./. | 11                        | 27 |
| 1o           | 12                        | 13,5 | 34   | ./.                       | ./. | ./. | 9                         | 23 |
| 11           | 14                        | o    | 34   | 15                        | o   | 37  | 12                        | 29 |
| 12           | 1o                        | 12   | 32   | 12                        | 14  | 34  | 13                        | 31 |
| 13           | o,5                       | o    | 8    | o,5                       | o   | 8   | 1                         | 7  |
| 14           | 1                         | 2    | 9    | 1                         | 3   | 11  | 2                         | 9  |
| 15           | 2                         | o    | 15   | ./.                       | ./. | ./. | 7                         | 19 |
| 16           | 1                         | o    | 7    | ./.                       | ./. | ./. | 1                         | 7  |
| 17           | 6                         | 7    | 21   | 8                         | 1o  | 25  | 7                         | 19 |
| 18           | 1                         | o    | 8    | 1                         | 3   | 13  | 1                         | 7  |
| 19           | 8                         | 1o   | 24   | 9                         | 11  | 28  | 1o                        | 25 |
| 2o           | 1                         | 4    | 12   | 1,5                       | 4,5 | 13  | 1                         | 7  |
| 21           | 9                         | 11   | 28   | 11                        | 15  | 32  | 1o                        | 25 |
| 22           | 9                         | 1o   | 27   | ./.                       | ./. | ./. | 8                         | 21 |
| 23           | 9                         | 11   | 26,5 | ./.                       | ./. | ./. | 9                         | 23 |
| 24           | 1                         | o    | 8    | 2,5                       | 5   | 16  | 1                         | 7  |

Fortsetzung von Tabelle 3:

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |    |    |                           |      |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|----|----|---------------------------|------|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |    | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |      |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B  | C  | A                         | B    | C    | A                         | C  |
| 25           | -                         | -  | -  | ./.                       | ./.  | ./.  | 2,5                       | 10 |
| 26           | 2                         | 0  | 15 | ./.                       | ./.  | ./.  | 3,5                       | 12 |
| 27           | 12                        | 0  | 30 | ./.                       | ./.  | ./.  | 12                        | 29 |
| 28           | 12                        | 0  | 29 | ./.                       | ./.  | ./.  | 12,5                      | 30 |
| 29           | 10                        | 12 | 27 | ./.                       | ./.  | ./.  | 9,5                       | 24 |
| 30           | 9                         | 10 | 25 | 8                         | 0    | 24   | 6,5                       | 18 |
| 31           | 1                         | 0  | 9  | 1                         | 2,5  | 12   | 1                         | 7  |
| 32           | 1                         | 2  | 10 | 3                         | 5    | 15   | 3,5                       | 12 |
| 33           | 3                         | 5  | 14 | 3,5                       | 6    | 15   | 3                         | 11 |
| 34           | 9                         | 11 | 25 | 9                         | 11,5 | 26,5 | 9,5                       | 24 |
| 35           | 13                        | 15 | 35 | ./.                       | ./.  | ./.  | 10                        | 25 |
| 36           | 9                         | 10 | 26 | ./.                       | ./.  | ./.  | 8,5                       | 22 |
| 37           | 12                        | 13 | 32 | ./.                       | ./.  | ./.  | 9                         | 23 |
| 38           | 13                        | 0  | 33 | 13                        | 15   | 35   | 11                        | 27 |
| 39           | 9                         | 11 | 31 | 11                        | 0    | 32   | 9                         | 23 |
| 40           | -                         | -  | -  | 1                         | 3    | 11   | 2                         | 9  |
| 41           | 4                         | 5  | 15 | 5                         | 6    | 18   | 5                         | 15 |

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß von 41 Kälbernieren bei Bac. stearothermophilus 38 eindeutig hemmstoffpositiv waren. Drei Proben (Nr. 13, 25, 40) waren negativ. Dagegen waren bei Bac. subtilis alle Nieren hemmstoffpositiv. Übereinstimmung der beiden Testkeime bei einer Agarschichthöhe von 2 mm bestand folglich bei 38 von 41 Kälbernieren.

Tabelle 4: Hemmstoffpositive Nieren von Schweinen  
(in die Tabelle ist die jeweils größte  
Hemmfläche in mm bei pH 6,0; 7,0 oder 8,0  
aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearrowthermophilus |     |      |                           |      |     | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|------|---------------------------|------|-----|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |      |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C    | A                         | B    | C   | A                         | C  |
| 1            | 8                         | 10  | 25   | 9,5                       | 11   | 27  | 7,5                       | 20 |
| 2            | 5,5                       | 7,5 | 18   | 7                         | 9    | 22  | 8                         | 21 |
| 3            | 2,5                       | 5   | 15   | 5                         | 7    | 18  | 5                         | 15 |
| 4            | 3                         | 6   | 16   | 5                         | 7    | 19  | 3,5                       | 12 |
| 5            | 7                         | 10  | 24   | 9                         | 10   | 25  | 8,5                       | 22 |
| 6            | 3                         | 5,5 | 17   | 7                         | 9    | 22  | 8                         | 21 |
| 7            | 5                         | 0   | 18   | ./.                       | ./.  | ./. | 6                         | 17 |
| 8            | 8                         | 10  | 25   | ./.                       | ./.  | ./. | 8                         | 21 |
| 9            | 9                         | 0   | 23   | 9                         | 0    | 26  | 9                         | 23 |
| 10           | 5,5                       | 7   | 18   | 6                         | 0    | 21  | 9                         | 23 |
| 11           | 8                         | 0   | 23   | ./.                       | ./.  | ./. | 8                         | 21 |
| 12           | 8                         | 11  | 24   | ./.                       | ./.  | ./. | 7                         | 19 |
| 13           | 1                         | 4   | 14   | ./.                       | ./.  | ./. | 1,5                       | 8  |
| 14           | 5                         | 0   | 18   | 8                         | 0    | 20  | 9                         | 23 |
| 15           | 8                         | 0   | 20   | 9                         | 0    | 26  | 9,5                       | 24 |
| 16           | 5                         | 6   | 17   | ./.                       | ./.  | ./. | 7                         | 19 |
| 17           | 11                        | 0   | 34   | ./.                       | ./.  | ./. | 10                        | 25 |
| 18           | 12                        | 0   | 29   | ./.                       | ./.  | ./. | 11,5                      | 28 |
| 19           | 4,5                       | 7   | 18   | ./.                       | ./.  | ./. | 10                        | 25 |
| 20           | 3                         | 4   | 13   | 4                         | 6    | 15  | 2,5                       | 10 |
| 21           | 6                         | 0   | 22   | ./.                       | ./.  | ./. | 6                         | 17 |
| 22           | 6,5                       | 0   | 18   | ./.                       | ./.  | ./. | 7                         | 19 |
| 23           | 10                        | 0   | 25   | 11                        | 0    | 27  | 13,5                      | 32 |
| 24           | 13                        | 0   | 31   | ./.                       | ./.  | ./. | 16                        | 37 |
| 25           | 8,5                       | 0   | 22   | ./.                       | ./.  | ./. | 12,5                      | 30 |
| 26           | 14                        | 15  | 37   | 15                        | 18   | 41  | 8                         | 21 |
| 27           | 10                        | 14  | 29   | ./.                       | ./.  | ./. | 9,5                       | 24 |
| 28           | 7                         | 9   | 23,5 | 9                         | 10,5 | 26  | 7                         | 19 |
| 29           | 5                         | 7   | 17   | ./.                       | ./.  | ./. | 5                         | 15 |
| 30           | 2,5                       | 4,5 | 12   | 3,5                       | 5,5  | 16  | 1                         | 7  |

Fortsetzung von Tabelle 4:

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |    |      |                           |     |     | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|----|------|---------------------------|-----|-----|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B  | C    | A                         | B   | C   | A                         | C  |
| 31           | 3                         | 6  | 16   | 5                         | 7   | 19  | 3,5                       | 12 |
| 32           | 7                         | 9  | 23   | 9                         | 11  | 21  | 7                         | 19 |
| 33           | 8                         | 10 | 25   | ./.                       | ./. | ./. | 6                         | 17 |
| 34           | 7                         | 0  | 21   | 9                         | 10  | 24  | 4,5                       | 14 |
| 35           | 2                         | 4  | 13,5 | 4                         | 6   | 15  | 3,5                       | 12 |
| 36           | 5                         | 0  | 18   | ./.                       | ./. | ./. | 5,5                       | 16 |
| 37           | 4                         | 6  | 16   | ./.                       | ./. | ./. | 9,5                       | 24 |
| 38           | 4                         | 5  | 16   | ./.                       | ./. | ./. | 4,5                       | 14 |

Die in Tabelle 4 aufgeführten Schweinenieren waren bei beiden Keimen eindeutig hemmstoffpositiv. Auffallend war, daß jeweils nur eine Probe bei Bac. subtilis (Nr. 30) und Bac. stearothermophilus (Nr. 13) eine Hemmzone von 1 mm hatte, alle anderen verursachten deutlich größere Hemmzonen. In der Aussage "hemmstoffpositiv" bestand bei den Testkeimen volle Übereinstimmung.

Zum Vergleich der Hemmhofgrößen bei *Bac. stearothermophilus* und *Bac. subtilis*, hervorgerufen durch hemmstoffhaltige Nieren, wurde aus Tabelle 2, 3 und 4 von den Werten A und C bei einer Agarschichthöhe von 2 mm jeweils der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet. Hemmzonen unter 1 mm wurden bei der Berechnung mitberücksichtigt.

| <u>Rindernieren aus Tabelle 2</u>        | A-Wert | C-Wert  |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 5,5 mm | 19,0 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 5,6 mm | 16,1 mm |

| <u>Kälbernieren aus Tabelle 3</u>        |        |         |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 6,1 mm | 19,9 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 6,3 mm | 17,5 mm |

| <u>Schweinenieren aus Tabelle 4</u>      |        |         |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 6,4 mm | 20,9 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 7,3 mm | 19,6 mm |

Die Differenz der arithmetischen Mittelwerte ist nur bei den C-Werten der Rindernieren aufgrund des t-Testes nach STUDENT bei 94 Freiheitsgraden (FG) signifikant. Die übrigen A- und C-Werte der Rinder-, Kälber und Schweinenieren haben bei 94 FG (Rindernieren), 80 FG (Kälbernieren) und 74 FG (Schweinenieren) keine signifikante Differenz.

In den Tabellen 5 bis 8 sind Lebern und Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen aufgeführt, deren Nieren sowohl bei *Bac. stearothermophilus* als auch *Bac. subtilis* hemmstoffpositiv waren. Verglichen wurden dabei auch Hemmzonen der beiden Testkeime unter 1 mm, und zwar bei 48 Rinderlebern (Tabelle 5), 38 Kälberlebern (Tabelle 6), 38 Schweinelebern (Tabelle 7) sowie 33 Muskelproben von Rindern, Kälbern und Schweinen (Tabelle 8).

Tabelle 5: Lebern von Rindern, deren Nieren hemmstoff-  
positiv waren (in die Tabelle ist die je-  
weils größte Hemmfläche in mm bei pH 6,0;  
7,0 oder 8,0 aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |   |      |                           |     |      | Bac. subtilis             |                |
|--------------|---------------------------|---|------|---------------------------|-----|------|---------------------------|----------------|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |   |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |                |
|              | A                         | B | C    | A                         | B   | C    | A                         | C              |
| 1            | 4                         | o | 17,5 | 5                         | o   | 18,5 | 4                         | 13             |
| 2            | 1,5                       | 3 | 11   | 2                         | o   | 12   | 0,5                       | 6              |
| 3            | 1                         | o | 10   | 2,5                       | 4,5 | 14   | 1                         | 7              |
| 4            | 1,5                       | o | 12   | 2,5                       | o   | 13,5 | 2                         | 9              |
| 5            | 2                         | o | 12   | 3                         | o   | 14   | 2                         | 9 <sup>x</sup> |
| 6            | 3                         | o | 13   | 4,5                       | o   | 16,5 | 2                         | 9              |
| 7            | 2,5                       | o | 12   | 4                         | o   | 14   | 1                         | 7              |
| 8            | 1,5                       | 3 | 11,5 | 2                         | 3   | 13   | 2                         | 9 <sup>x</sup> |
| 9            | 3                         | o | 15   | 4                         | o   | 18   | 3                         | 11             |
| 10           | 6,5                       | o | 20   | 7,5                       | o   | 22   | 6                         | 17             |
| 11           | 1                         | 2 | 9    | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7 <sup>x</sup> |
| 12           | 0,5                       | o | 7    | 0,5                       | o   | 7    | 0,5                       | 6              |
| 13           | 1                         | o | 10   | 2                         | o   | 11,5 | 1                         | 7              |
| 14           | 7                         | o | 24   | 8                         | o   | 25   | 4                         | 13             |
| 15           | 5,5                       | 9 | 21   | 6                         | o   | 23   | 2                         | 9              |
| 16           | 5                         | 6 | 18   | 5                         | 6,5 | 19   | 3                         | 11             |
| 17           | 1                         | 3 | 11   | 1                         | 3   | 12   | 0,5                       | 6 <sup>x</sup> |
| 18           | -                         | - | -    | 1                         | 2   | 11   | 0,5                       | 6 <sup>x</sup> |
| 19           | -                         | - | -    | -                         | -   | -    | 0,5                       | 6 <sup>x</sup> |
| 20           | 3                         | o | 15   | ./.                       | ./. | ./.  | 3                         | 11             |
| 21           | 10                        | o | 25   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17             |
| 22           | 2                         | 3 | 13   | 4                         | 5   | 18   | 2                         | 9              |
| 23           | 1,5                       | o | 12,5 | ./.                       | ./. | ./.  | 2,5                       | 10             |
| 24           | 5                         | 7 | 18   | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13             |
| 25           | 5                         | 6 | 18   | ./.                       | ./. | ./.  | 5                         | 15             |
| 26           | 1                         | o | 12   | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7 <sup>x</sup> |
| 27           | -                         | - | -    | ./.                       | ./. | ./.  | 0,5                       | 6 <sup>x</sup> |
| 28           | 6                         | 8 | 21   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17             |
| 29           | 6                         | o | 22   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17             |
| 30           | 9                         | o | 22   | ./.                       | ./. | ./.  | 4,5                       | 14             |

Fortsetzung von Tabelle 5:

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |     |    |                           |     |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|----|---------------------------|-----|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |    | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C  | A                         | B   | C    | A                         | C  |
| 31           | 4                         | 6   | 18 | ./.                       | ./. | ./.  | 2,5                       | 10 |
| 32           | 2                         | 5   | 15 | 3                         | 5   | 16   | 3,5                       | 12 |
| 33           | 2,5                       | 5   | 15 | 4                         | 5   | 18   | 1,5                       | 8  |
| 34           | 6                         | 0   | 20 | ./.                       | ./. | ./.  | 4,5                       | 14 |
| 35           | 3                         | 0   | 13 | ./.                       | ./. | ./.  | -                         | -  |
| 36           | 0,5                       | 0   | 8  | 6                         | 0   | 20   | 2,5                       | 10 |
| 37           | 7                         | 8   | 21 | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17 |
| 38           | 3                         | 0   | 17 | 5                         | 0   | 20   | 3,5                       | 12 |
| 39           | 1                         | 0   | 10 | 2                         | 0   | 11   | 0,5                       | 6  |
| 40           | 2                         | 0   | 13 | 3                         | 0   | 15   | 1                         | 7  |
| 41           | 2                         | 0   | 11 | 3                         | 0   | 12   | 0,5                       | 6  |
| 42           | 1                         | 3   | 11 | 1,5                       | 3   | 13   | 1                         | 7  |
| 43           | 3                         | 0   | 14 | 4                         | 0   | 17,5 | 3                         | 11 |
| 44           | 6,5                       | 0   | 20 | 7,5                       | 0   | 22   | 6                         | 17 |
| 45           | 4                         | 5   | 17 | 5                         | 6   | 18   | 1                         | 7  |
| 46           | 4                         | 5   | 17 | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13 |
| 47           | 3                         | 4,5 | 15 | ./.                       | ./. | ./.  | 2,5                       | 10 |
| 48           | 1                         | 0   | 12 | ./.                       | ./. | ./.  | 2                         | 9  |

Zeichenerklärung:

x = mehr oder weniger starkes Wachstum von Kontaminationskeimen, von dem aufgelegten Leberstück ausgehend.

Aus Tabelle 5 ist zu ersehen, daß von 48 Rinderlebern bei Bac. stearothermophilus 43 eindeutig hemmstoffpositiv waren und fünf Proben (Nr. 12, 18, 19, 27, 36) hemmstoffnegativ.

Bei Bac. subtilis waren 39 eindeutig positiv und neun Proben (Nr. 2, 12, 17, 18, 19, 27, 35, 39, 41) negativ.

Übereinstimmung der hemmstoffnegativen Lebern bestand bei den beiden Testkeimen viermal (Proben Nr. 12, 18, 19, 27). Fünfmal war mit Bac. stearothermophilus

Hemmstoff nachweisbar (Proben Nr. 2, 17, 35, 39, 41), nicht jedoch mit Bac. subtilis.

Bei sieben Rinderleberproben auf dem Bac. subtilis-Agargemisch wurde das Ablesen der Ergebnisse durch fremdes Bakterienwachstum, ausgehend von dem Leberstück erschwert (Proben Nr. 5, 8, 11, 17, 18, 26, 27). Aus der nachfolgenden Aufstellung ergibt sich die Anzahl der Übereinstimmungen bzw. Nichtübereinstimmungen zwischen den beiden Testkeimen:

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| Übereinstimmung der positiven Proben: | 38 |
| Übereinstimmung der negativen Proben: | 4  |
| Keine Übereinstimmung:                | 6  |

Tabelle 6: Lebern von Kälbern, deren Nieren hemmstoff-  
positiv waren (in die Tabelle ist die je-  
weils größte Hemmfläche in mm bei pH 6,0;  
7,0 oder 8,0 aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearothermophilus   |     |      |                           |     |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|------|---------------------------|-----|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C    | A                         | B   | C    | A                         | C  |
| 1            | 1                         | o   | 11   | 1,5                       | o   | 11,5 | 1                         | 7  |
| 2            | 1                         | o   | 1o   | 2                         | o   | 12   | o,5                       | 6  |
| 3            | -                         | -   | -    | 2                         | o   | 13   | o,5                       | 6  |
| 4            | -                         | -   | -    | -                         | -   | -    | o,5                       | 6  |
| 5            | 1                         | 3   | 11,5 | 1,5                       | 3   | 12   | o,5                       | 6  |
| 6            | o,5                       | o   | 7    | 1                         | 2   | 11   | o,5                       | 6  |
| 7            | 5,5                       | 6,5 | 18,5 | 5,5                       | 7,5 | 2o   | 5,5                       | 16 |
| 8            | 7                         | 1o  | 26   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17 |
| 9            | 11                        | o   | 29   | ./.                       | ./. | ./.  | 7,5                       | 2o |
| 1o           | 11                        | 12  | 3o   | ./.                       | ./. | ./.  | 7                         | 19 |
| 11           | 1o                        | 12  | 28   | 1o                        | o   | 3o   | 8,5                       | 22 |
| 12           | 8                         | o   | 27   | 7                         | 11  | 31   | 6,5                       | 18 |
| 13           | -                         | -   | -    | 1                         | o   | 1o   | -                         | -  |
| 14           | 3                         | 5   | 15   | ./.                       | ./. | ./.  | 5,5                       | 16 |
| 15           | -                         | -   | -    | o,5                       | o   | 7    | o,5                       | 6  |
| 16           | 1,5                       | 2,5 | 12,5 | ./.                       | ./. | ./.  | 2                         | 9  |
| 17           | o,5                       | o   | 8    | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 18           | 8,5                       | 11  | 26   | ./.                       | ./. | ./.  | 9,5                       | 24 |
| 19           | 1                         | o   | 12   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 2o           | 5                         | 8   | 23   | 8                         | o   | 28   | 7,5                       | 2o |
| 21           | 4                         | 6   | 17   | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13 |
| 22           | 4                         | 6,5 | 17   | ./.                       | ./. | ./.  | 4,5                       | 14 |
| 23           | -                         | -   | -    | o,5                       | o   | 7    | -                         | -  |
| 24           | -                         | -   | -    | ./.                       | ./. | ./.  | 2                         | 9  |
| 25           | 1o                        | o   | 25   | ./.                       | ./. | ./.  | 9                         | 23 |
| 26           | 3,5                       | o   | 12   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 27           | 5                         | 8   | 21   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17 |
| 28           | 5                         | 6   | 17   | 6                         | 7   | 19   | 3,5                       | 12 |
| 29           | -                         | -   | -    | 1                         | o   | 11,5 | o,5                       | 6  |
| 3o           | -                         | -   | -    | 1                         | 3   | 12   | -                         | -  |

Fortsetzung von Tabelle 6:

| Probe<br>Nr. | Bac. stearoothermophilus  |     |      |                           |     |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|------|---------------------------|-----|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C    | A                         | B   | C    | A                         | C  |
| 31           | -                         | -   | -    | 2                         | o   | 12,5 | -                         | -  |
| 32           | 5                         | o   | 17   | 6                         | o   | 2o   | 5,5                       | 16 |
| 33           | 8                         | 9   | 24   | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17 |
| 34           | 1o                        | o   | 27   | ./.                       | ./. | ./.  | 6,5                       | 18 |
| 35           | 9                         | 11  | 29   | ./.                       | ./. | ./.  | 7                         | 19 |
| 36           | 9,5                       | 11  | 27   | 1o                        | o   | 29   | 7,5                       | 2o |
| 37           | 7                         | o   | 25   | 8                         | o   | 27   | 6,5                       | 18 |
| 38           | 1,5                       | 2,5 | 12,5 | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |

Aus Tabelle 6 ist zu ersehen, daß von 38 Kälberlebern bei Bac. stearoothermophilus 27 eindeutig hemmstoffpositiv waren und 11 Proben (Nr. 3, 4, 6, 13, 15, 17, 23, 24, 29, 3o, 31) hemmstoffnegativ.

Bei Bac. subtilis waren 24 eindeutig positiv und 14 Proben (Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 29, 3o, 31) negativ.

Übereinstimmung der hemmstoffnegativen Lebern bestand bei den beiden Keimen zehnmal (Proben Nr. 3, 4, 6, 13, 15, 17, 23, 29, 3o, 31).

Viermal war mit Bac. stearoothermophilus Hemmstoff nachweisbar (Proben Nr. 2, 5, 19, 26), nicht jedoch mit Bac. subtilis, umgekehrt einmal (Probe Nr. 24).

Aus der nachfolgenden Aufstellung ergibt sich die Anzahl der Übereinstimmungen bzw. Nichtübereinstimmungen zwischen den beiden Testkeimen:

Übereinstimmung der positiven Proben: 23

Übereinstimmung der negativen Proben: 1o

Keine Übereinstimmung: 5

Tabelle 7: Lebern von Schweinen, deren Nieren hemmstoff-  
positiv waren (in die Tabelle ist die je-  
weils größte Hemmfläche in mm bei pH 6,0;  
7,0 oder 8,0 aufgenommen worden)

| Probe<br>Nr. | Bac. stearoothermophilus  |    |      |                           |     |      | Bac. subtilis             |                 |
|--------------|---------------------------|----|------|---------------------------|-----|------|---------------------------|-----------------|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |      | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |                 |
|              | A                         | B  | C    | A                         | B   | C    | A                         | C               |
| 1            | 4                         | 7  | 18   | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7 <sup>x</sup>  |
| 2            | 3                         | 5  | 16   | 3                         | 5   | 16   | 1                         | 7 <sup>x</sup>  |
| 3            | 3,5                       | o  | 15   | 3,5                       | o   | 16   | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 4            | 5,5                       | o  | 16,5 | 7                         | o   | 19   | 4                         | 13              |
| 5            | 2                         | o  | 13   | 2,5                       | o   | 14   | 1                         | 7 <sup>x</sup>  |
| 6            | 2,5                       | o  | 11   | 4                         | o   | 13   | 1                         | 7 <sup>x</sup>  |
| 7            | 3                         | o  | 14   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6 <sup>x</sup>  |
| 8            | 2,5                       | 4  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 9            | 3                         | 6  | 18   | 4                         | o   | 19,5 | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 10           | 3                         | o  | 14   | 3                         | o   | 16   | o,5                       | 6 <sup>x</sup>  |
| 11           | 2                         | o  | 12   | ./.                       | ./. | ./.  | 3                         | 11 <sup>x</sup> |
| 12           | 1,5                       | 4  | 14   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6               |
| 13           | -                         | -  | -    | 1                         | 3   | 12   | -                         | -               |
| 14           | 1                         | o  | 12   | 1,5                       | 3   | 12   | o,5                       | 6               |
| 15           | 1                         | 2  | 11   | 2                         | 4   | 12   | -                         | -               |
| 16           | 2                         | o  | 14   | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7               |
| 17           | 3                         | 5  | 17   | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13              |
| 18           | 3                         | 5  | 14   | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13              |
| 19           | 2                         | 4  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5 <sup>x</sup>          | 6               |
| 20           | 2                         | 4  | 13   | 3                         | 5   | 15   | o,5                       | 6 <sup>x</sup>  |
| 21           | 2                         | o  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6 <sup>x</sup>  |
| 22           | 4                         | o  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6 <sup>x</sup>  |
| 23           | 4                         | o  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | -                         | -               |
| 24           | 4                         | o  | 13   | ./.                       | ./. | ./.  | 5                         | 15              |
| 25           | 3,5                       | o  | 12   | ./.                       | ./. | ./.  | 3                         | 11              |
| 26           | 5                         | o  | 19   | 5                         | 6   | 21   | 2                         | 9               |
| 27           | 11                        | 12 | 29   | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6               |
| 28           | 3                         | 5  | 16   | 4                         | 6   | 18   | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 29           | 2,5                       | 5  | 16   | 2,5                       | 5,5 | 18   | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 30           | 1,5                       | 4  | 14   | 3,5                       | o   | 16   | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |

Fortsetzung von Tabelle 7:

| Probe<br>Nr. | Bac. <u>stearothermophilus</u> |   |    |                           |     |     | Bac. <u>subtilis</u>      |                 |
|--------------|--------------------------------|---|----|---------------------------|-----|-----|---------------------------|-----------------|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe      |   |    | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |                 |
|              | A                              | B | C  | A                         | B   | C   | A                         | C               |
| 31           | 4,5                            | o | 15 | 6                         | o   | 16  | 2                         | 9               |
| 32           | 2                              | 4 | 13 | ./.                       | ./. | ./. | 2                         | 9               |
| 33           | 3                              | 6 | 16 | 3                         | 6   | 19  | 3                         | 11 <sup>x</sup> |
| 34           | 4                              | o | 13 | 5                         | o   | 15  | o,5                       | 6               |
| 35           | 1                              | o | 1o | ./.                       | ./. | ./. | 4                         | 13              |
| 36           | 2                              | o | 13 | ./.                       | ./. | ./. | o,5                       | 6               |
| 37           | 2                              | 4 | 13 | ./.                       | ./. | ./. | 2                         | 9 <sup>x</sup>  |
| 38           | 1,5                            | o | 12 | ./.                       | ./. | ./. | o,5                       | 6               |

Zeichenerklärung:

x = mehr oder weniger starkes Wachstum von Kontaminationskeimen von dem aufgelegten Leberstück ausgehend.

Aus Tabelle 7 ist zu ersehen, daß von 38 Schweinelebern bei Bac. stearothermophilus 37 eindeutig hemmstoffpositiv waren und eine Probe (Nr. 13) hemmstoffnegativ.

Bei Bac. subtilis waren 23 eindeutig positiv und 15 Proben (Nr. 7, 1o, 12, 13, 14, 15, 19, 2o, 21, 22, 23, 27, 34, 36, 38) negativ.

Aus der nachfolgenden Aufstellung ergibt sich die Anzahl der Übereinstimmungen bzw. Nichtübereinstimmungen zwischen den beiden Testkeimen:

Übereinstimmung der positiven Proben: 23

Übereinstimmung der negativen Proben: 1

Keine Übereinstimmung: 14

Mit Bac. stearothermophilus konnten bei allen drei Tierarten mehr hemmstoffpositive Lebern ermittelt werden als mit Bac. subtilis.

Zum Vergleich der Hemmhofgrößen bei *Bac. subtilis* und *Bac. stearothermophilus* wurde aus Tabelle 5, 6 und 7 von den Werten A und C bei einer Agarschichthöhe von 2 mm der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet. Hemmzonen unter 1 mm sowie hemmstoffnegative Proben wurden bei der Berechnung mitberücksichtigt.

| <u>Rinderlebern aus Tabelle 5</u>        | A-Wert | C-Wert  |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 3,2 mm | 14,2 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 2,6 mm | 10,0 mm |

| <u>Kälberlebern aus Tabelle 6</u>        |        |         |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 4,1 mm | 14,9 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 3,7 mm | 11,9 mm |

| <u>Schweinelebern aus Tabelle 7</u>      |        |         |
|------------------------------------------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> $\bar{x}$ | 2,9 mm | 14,0 mm |
| <i>Bac. subtilis</i> $\bar{x}$           | 1,6 mm | 7,8 mm  |

Eine signifikante Differenz der arithmetischen Mittelwerte ergibt sich aufgrund des t-Testes nach STUDENT bei den C-Werten der Rinderlebern (96 Freiheitsgrade) sowie den A- und C-Werten der Schweinelebern (74 Freiheitsgrade). Keine signifikante Differenz der Mittelwerte besteht bei den A-Werten der Rinderlebern (96 Freiheitsgrade) sowie den A- und C-Werten der Kälberlebern (74 Freiheitsgrade).

Tabelle 8: Muskulatur von Rindern (Probe Nr. 1 bis 7), Kälbern (Probe Nr. 8 bis 23) und Schweinen (Probe Nr. 24 bis 33), deren Nieren hemmstoffpositiv waren

| Probe<br>Nr. | Bac. stearo-thermophilus  |     |    |                           |     |      | Bac. subtilis             |    |
|--------------|---------------------------|-----|----|---------------------------|-----|------|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |     |    | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |      | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                         | B   | C  | A                         | B   | C    | A                         | C  |
| 1            | 1                         | o   | 11 | 1,5                       | o   | 11,5 | 1,5                       | 8  |
| 2            | 2                         | 4   | 13 | 2,5                       | 4,5 | 15,5 | o,5                       | 6  |
| 3            | 2                         | 4   | 13 | 2,5                       | 5,5 | 16   | 2                         | 9  |
| 4            | 4                         | 5   | 15 | 4                         | 5,5 | 15,5 | 2                         | 9  |
| 5            | 9                         | 1o  | 22 | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |
| 6            | 1                         | 4   | 12 | ./.                       | ./. | ./.  | 2,5                       | 1o |
| 7            | 3                         | 5   | 14 | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |
| 8            | 5                         | 6   | 18 | 8                         | o   | 25   | 4                         | 13 |
| 9            | 2                         | 5   | 16 | 4                         | o   | 18   | 3                         | 11 |
| 1o           | o,5                       | o   | 7  | 3                         | 5   | 17   | o,5                       | 6  |
| 11           | -                         | -   | -  | o,5                       | o   | 7    | o,5                       | 6  |
| 12           | 3,5                       | o   | 14 | 4                         | o   | 14,5 | 4                         | 13 |
| 13           | 4                         | 7   | 18 | 6                         | o   | 22   | 2                         | 9  |
| 14           | 4                         | o   | 16 | 6                         | o   | 19   | o,5                       | 6  |
| 15           | 8                         | 1o  | 25 | ./.                       | ./. | ./.  | 4                         | 13 |
| 16           | 2                         | 4   | 13 | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |
| 17           | 3                         | 4   | 13 | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 18           | 2                         | o   | 12 | 2,5                       | 4   | 15   | 2                         | 9  |
| 19           | -                         | -   | -  | -                         | -   | -    | 1,5                       | 8  |
| 2o           | 2                         | o   | 11 | 2                         | o   | 12   | o,5                       | 6  |
| 21           | 1                         | 3   | 12 | 3                         | o   | 12   | 2                         | 9  |
| 22           | 4                         | o   | 13 | 4                         | o   | 13   | 2,5                       | 1o |
| 23           | 8                         | o   | 22 | ./.                       | ./. | ./.  | 6                         | 17 |
| 24           | -                         | -   | -  | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 25           | 2                         | 3   | 12 | ./.                       | ./. | ./.  | 1                         | 7  |
| 26           | 1                         | 2,5 | 9  | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 27           | -                         | -   | -  | 1                         | 2   | 12   | o,5                       | 6  |
| 28           | 1                         | 3   | 12 | ./.                       | ./. | ./.  | -                         | -  |
| 29           | o,5                       | o   | 7  | ./.                       | ./. | ./.  | o,5                       | 6  |
| 3o           | 2,5                       | o   | 1o | 2,5                       | 4   | 13   | -                         | -  |

Fortsetzung von Tabelle 8:

| Probe<br>Nr. | Bac. <i>stearothermophilus</i> |   |    |                           |     |     | Bac. <i>subtilis</i>      |    |
|--------------|--------------------------------|---|----|---------------------------|-----|-----|---------------------------|----|
|              | 2 mm Agar-<br>schichthöhe      |   |    | 1 mm Agar-<br>schichthöhe |     |     | 2 mm Agar-<br>schichthöhe |    |
|              | A                              | B | C  | A                         | B   | C   | A                         | C  |
| 31           | 6                              | 7 | 22 | 8                         | 10  | 25  | 1                         | 7  |
| 32           | 4,5                            | 0 | 14 | ./.                       | ./. | ./. | 0,5                       | 6  |
| 33           | 6,5                            | 0 | 18 | ./.                       | ./. | ./. | 4,5                       | 14 |

Aus Tabelle 8 ist zu ersehen, daß von 33 Muskelproben von Rindern, Kälbern und Schweinen bei Bac. *stearothermophilus* 27 eindeutig hemmstoffpositiv waren und sechs Proben (Nr. 10, 11, 19, 24, 27, 29) hemmstoffnegativ.

Bei Bac. *subtilis* waren 20 positiv und 13 Proben (Nr. 2, 10, 11, 14, 17, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32) negativ.

Übereinstimmung der hemmstoffnegativen Muskelproben bestand bei den beiden Keimen fünfmal (Proben Nr. 10, 11, 24, 27, 29).

Achtmal war mit Bac. *stearothermophilus* Hemmstoff nachweisbar (Proben Nr. 2, 14, 17, 20, 26, 28, 30, 32), nicht jedoch mit Bac. *subtilis*, umgekehrt einmal (Probe Nr. 19).

Aus der nachfolgenden Aufstellung ergibt sich die Anzahl der Übereinstimmungen bzw. Nichtübereinstimmungen zwischen den beiden Testkeimen:

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| Übereinstimmung der positiven Proben: | 19 |
| Übereinstimmung der negativen Proben: | 5  |
| Keine Übereinstimmung:                | 9  |

Zum Vergleich der Hemmhofgrößen bei *Bac. stearothermophilus* und *Bac. subtilis* wurde aus Tabelle 8 von den Werten A und C bei einer Agarschichthöhe von 2 mm der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet. Hemmzonen unter 1 mm sowie hemmstoffnegative Proben wurden bei der Berechnung mitberücksichtigt.

Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen aus  
Tabelle 8

|                                |           | A-Wert | C-Wert  |
|--------------------------------|-----------|--------|---------|
| <i>Bac. stearothermophilus</i> | $\bar{x}$ | 2,9 mm | 12,5 mm |
| <i>Bac. subtilis</i>           | $\bar{x}$ | 1,6 mm | 8,0 mm  |

Muskulatur, die von Tieren stammte, deren Nieren sowohl bei *Bac. subtilis* als auch bei *Bac. stearothermophilus* hemmstoffpositiv gewesen ist, verursachte bei *Bac. stearothermophilus* deutlich größere Hemmhöfe.

Die Differenz der arithmetischen Mittelwerte von den A- und C-Werten dieser Muskulatur (Rinder, Kälber und Schweine) ist aufgrund des t-Testes nach STUDENT bei 64 Freiheitsgraden signifikant.

c) Hemmstofffreie Nieren von Rindern, Kälbern und  
Schweinen

Verglichen wurden zunächst 70 Rindernieren und 10 Kälbernieren. 65 Rindernieren waren sowohl bei *Bac. subtilis* als auch bei *Bac. stearothermophilus* eindeutig negativ. 9 Kälbernieren waren ebenfalls bei beiden Keimen negativ. Eine Kälbernieren war bei *Bac. subtilis* negativ, zeigte jedoch bei *Bac. stearothermophilus* eine Hemmzone von 0,5 mm.

Bei zwei Rindernieren bestand bei *Bac. subtilis* einmal bei pH 6 und einmal bei pH 8 eine Hemmung von 0,5 mm, während bei diesen Nieren bei *Bac. stearothermophilus* keine Hemmung feststellbar war.

Bei zwei Rindernieren war bei *Bac. subtilis* keine Hemmung, jedoch eine von 0,5 mm bei *Bac. stearothermophilus*, davon einmal nur bei dem tiefgefrorenen Organzyylinder und einmal nur bei dem Filterpapierblättchen. Die entsprechende Gegenprobe (Filterpapier bzw. Organzyylinder) war auch bei *Bac. stearothermophilus* negativ.

Bei einer Rinderniere bestand bei *Bac. subtilis* sowohl bei pH 6 und pH 8 eine Hemmung von 0,5 mm, eine gleiche bestand bei *Bac. stearothermophilus*.

Beurteilt man eine Hemmung von 0,5 mm als negativ, so bestand bei den Rinder- und Kälbernieren bei den hemmstoffnegativen Proben volle Übereinstimmung zwischen *Bac. stearothermophilus* und *Bac. subtilis*.

Verglichen wurden außerdem 70 hemmstofffreie Schweinenieren. Davon waren bei *Bac. subtilis* 60 eindeutig negativ; bei 5 Proben war entweder bei pH 6 oder pH 8 eine Hemmung von 0,5 mm feststellbar und bei 5 Nieren bestand sowohl bei pH 6 als auch bei pH 8 eine Hemmung von 0,5 mm (also auch negativ).

Der Test mit *Bac. stearothermophilus* zeigte keine der 70 Nieren als negativ an; vielmehr verursachten sämtliche Proben bei diesem Keim deutliche Hemmhöfe sowohl mit dem Organzyylinder als auch mit dem Filterpapierblättchen. Die Hemmzonen reichten von 1 mm bis zu 4 mm, wobei Hemmhofdurchmesser von 8 bis 14 mm entstanden.

Nierenproben, die bei *Bac. subtilis* eine Hemmzone von 0,5 mm hatten, also negativ waren, erzeugten bei *Bac. stearothermophilus* Hemmzonen von 2 mm bis 4 mm.

d) Hemmstofffreie Muskulatur von Rindern, Kälbern und Schweinen

Verglichen wurden 50 Muskelproben von Rindern, 30 Muskelproben von Kälbern und 40 Muskelproben von Schweinen. Keine der Proben verursachte bei *Bac. stearothermophilus* oder *Bac. subtilis* eine Hemmung des Keimwachstums.

### 3. Bac. stearothermophilus var. calidolactis C 953

#### a) Haltbarkeit der Suspension

##### Lagerung bei + 2°C

An Hand von Keimzahlbestimmungen im Oberflächenverfahren (Spatelverfahren) wurde festgestellt, daß bei einer Ausgangskeimdichte von  $10^7$  Keime/ml Keimsuspension nach acht Tagen nur noch  $3 \times 10^5$  lebensfähige Keime übrig geblieben waren, also nur noch 3 % der Ausgangsdichte. Bis zum vierten Tag blieb die Keimdichte der Ausgangssuspension fast gleich, fiel jedoch dann bis zum achten Tag schnell auf  $3 \times 10^5$  Keime/ml ab. Bei weiterer Lagerung (drei Wochen) verringerte sich die Keimzahl kontinuierlich bis auf  $3 \times 10^3$ , das sind 0,03 % der Ausgangskeimdichte.

##### Lagerung bei - 20°C

Bei einer Lagerung der Bazillen-Suspension (14 Tage) bei -20°C konnte keine nennenswerte Verringerung der lebensfähigen Bazillen festgestellt werden. Wegen dieser guten Haltbarkeit bei - 20°C wurde versucht, Agar-Keimsuspensionen nach dem Auftauen zu bebrüten. Hemmhöfe waren jedoch danach nicht mehr deutlich ablesbar, da sich die Struktur des Agars verändert hatte.

#### b) Verschiedene Agarschichtdicke des Testsystems

Ergebnisse von 81 hemmstoffpositiven Rinder-, Kälber- und Schweinenieren bei 2 mm und 1 mm Agarschichthöhe (siehe Tabelle 2, 3 und 4).

Bei einer Kälbernieren war bei einer Schichthöhe von 1 mm sowohl der A- als auch der C-Wert kleiner als die entsprechenden Werte bei 2 mm Schichthöhe. Zwölfmal war der A-Wert gleich groß, dabei aber nur zweimal auch der C-Wert. Bei den restlichen zehn Nieren war der C-Wert bei 1 mm Schichthöhe immer größer. 68 mal war sowohl der A-Wert als auch der C-Wert bei 1 mm Agarschichthöhe eindeutig größer als bei 2 mm. Von den 81 Proben waren 3 Nieren von Rindern und Kälbern bei 1 mm hemmstoffpositiv, nicht jedoch bei 2 mm, das sind 3,7 %.

Zum Vergleich der Hemmhofgrößen zwischen 2 mm Agarschichthöhe und 1 mm wurde aus den A- und C-Werten der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet:

|                      |           | A-Wert | C-Wert  |
|----------------------|-----------|--------|---------|
| 2 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 5,3 mm | 18,7 mm |
| 1 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 6,5 mm | 21,6 mm |

Durch eine Verringerung der Agarschichtdicke von 2 mm auf 1 mm sind die Hemmhofmittelwerte, verursacht durch hemmstoffhaltige Nieren, deutlich größer geworden. Die Differenz der Mittelwerte sowohl aus den A-Werten als auch C-Werten ist aufgrund des t-Testes nach STUDENT bei 160 Freiheitsgraden signifikant.

Ergebnisse von 66 hemmstoffpositiven Rinder-, Kälber- und Schweinelebern bei 2 mm und 1 mm Agarschichthöhe (siehe Tabelle 5, 6 und 7).

Bei einer Kälberleber war der A-Wert bei 2 mm Agarschichthöhe größer, jedoch der C-Wert kleiner als bei 1 mm. Elfmal war der A-Wert gleich groß, davon auch zweimal der C-Wert; bei den restlichen neun war bei 1 mm Agarschichthöhe der C-Wert immer größer. 54 mal war sowohl der A-Wert als auch der C-Wert bei 1 mm Agarschichthöhe eindeutig größer als bei 2 mm. Von den 66 Leberproben waren 9 bei 1 mm hemmstoffpositiv, nicht jedoch bei 2 mm, das sind 13,4 %.

Der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) der A- und C-Werte der Lebern betrug bei:

|                      |           | A-Wert | C-Wert  |
|----------------------|-----------|--------|---------|
| 2 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 2,8 mm | 14,3 mm |
| 1 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 3,7 mm | 16,3 mm |

Auch bei den Lebern sind die Hemmhofmittelwerte bei 1 mm Agarschichtdicke deutlich größer als bei 2 mm. Die Differenz der Mittelwerte aus den A-Werten und C-Werten ist ebenfalls aufgrund des t-Testes nach STUDENT bei 130 Freiheitsgraden signifikant.

Ergebnisse von 18 hemmstoffpositiven Muskelproben (Rinder, Kälber und Schweine) bei 2 mm und 1 mm Agarschichthöhe (siehe Tabelle 8).

Viermal war der A-Wert gleich groß bei 1 mm und 2 mm Schichthöhe, davon auch einmal der C-Wert. Bei 14 Proben war sowohl der A-Wert als auch der C-Wert bei 1 mm Agarschichthöhe größer als bei 2 mm. Von den 18 Muskelproben waren 2 bei 1 mm hemmstoffpositiv, nicht jedoch bei 2 mm, das sind 11,1 %.

Der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) der A- und C-Werte der Muskulatur betrug bei:

|                      |           | A-Wert | C-Wert  |
|----------------------|-----------|--------|---------|
| 2 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 2,5 mm | 13,3 mm |
| 1 mm Agarschichthöhe | $\bar{x}$ | 3,6 mm | 15,7 mm |

Bei 34 Freiheitsgraden ist die Differenz der Mittelwerte aus den A- und C-Werten aufgrund des t-Testes nach STUDENT nicht signifikant.

#### c) Verschiedene Keimkonzentrationen im Agar

Mit einer Ausgangskeimkonzentration von  $10^7$  /ml Agar war es möglich, nach zwei Stunden bei hemmstoffhaltigem Material deutliche Hemmhöfe abzulesen. Diese Keimkonzentration reichte aus, um im pH-Wertbereich von 6 und 7 bei bereits acht Tagen alten Platten nach zwei Stunden immer noch Hemmhöfe ablesen zu können. Bei pH 8 war das schon bei 2 Tagen alten Platten nicht mehr möglich; hier wurden deutlich längere Bebrütungszeiten benötigt.

Bei einer Ausgangskeimkonzentration von  $10^6$  bis  $3 \times 10^6$  /ml Agar waren Bebrütungszeiten bis zu 3 Stunden erforderlich, bei  $10^6$  Keimen/ml ab dem 7. Tag nach Herstellung der Platten sogar 4 Stunden. Platten mit pH 8 mußten schon nach 2 Tagen Lagerung länger bebrütet werden. Bei Erniedrigung der Keimzahl bis zu  $3 \times 10^5$  /ml Agar war nur bei frisch

hergestellten Platten (bis 24 Stunden alt) nach drei Stunden ein deutliches Ergebnis ablesbar. Bei Platten, die älter als ein Tag waren, wurden mindestens vier Stunden benötigt.

Konzentrationen von  $10^5$ /ml Agar und darunter erforder-  
ten Bebrütungszeiten von vier bis sechs Stunden, um  
deutliche Hemmhöfe sichtbar zu machen.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Hemmwirkung von  
Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen auf  
Bac. stearoothermophilus-Keimkonzentrationen von  $10^7$   
Keimen/ml Agar bei 2-stündiger Bebrütung sowie  $10^6$   
Keimen/ml Agar bei 3-stündiger Bebrütungszeit jeweils  
bei + 63 bis 65°C dargestellt.

Tabelle 9: Hemmwirkung von Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen auf *Bac. stearothermophilus*-Keimkonzentrationen von  $10^7$  Keime/ml Agar und  $10^6$  Keime/ml Agar

| Substanz                    | pH 6,0   |        | pH 7,0   |        | pH 8,0   |        |
|-----------------------------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
|                             | Keimzahl |        | Keimzahl |        | Keimzahl |        |
|                             | $10^7$   | $10^6$ | $10^7$   | $10^6$ | $10^7$   | $10^6$ |
| Penicillin 1.5 I.E.         | 9,5      | 12,5   | 9,5      | 13,0   | 10,0     | 13,5   |
| Streptomycin 10 $\mu$ g     | 2        | 3,5    | 4        | 6      | 4        | 7      |
| Chlortetracyclin 10 $\mu$ g | 6        | 9      | 4        | 5      | 3        | 7      |
| Oxytetracyclin 10 $\mu$ g   | 5,5      | 7      | 4        | 5,5    | 3        | 5,5    |
| Chloramphenicol 10 $\mu$ g  | 3        | 5      | 3        | 5      | 3        | 5      |
| Neomycin 10 $\mu$ g         | 3        | 5      | 4,5      | 6,5    | 5        | 9      |
| Furazolidon 50 $\mu$ g      | 3        | 6,5    | 3        | 8      | 3,5      | 8      |

Die Zahlen geben die Entfernung in Millimetern vom hemmstoffhaltigen Filterpapierrand bis zum wachstumsfreien Rand im Agar an.

Aus dem Antibiotogramm in Tabelle 9 ist zu ersehen, daß die Hemmhöfe bei Verwendung von  $10^7$  Keimen/ml Agar deutlich kleiner waren als bei  $10^6$  Keimen/ml Agar.

Aus Tabelle 10 sind die Befunde ersichtlich, die bei gleichen Keimzahlen und Bebrütungszeiten wie in Tabelle 9, jedoch mit hemmstoffpositiven Nieren und Muskelproben, erzielt worden sind.

Tabelle 10: Hemmhofgröße in mm von hemmstoffpositiven Rindernieren (Probe Nr. 1 bis 14) und Muskulatur (Probe Nr. 15 bis 20) bei Keimkonzentrationen von  $10^7$  Keimen/ml Agar und  $10^6$  Keimen/ml Agar

| Probe<br>Nr. | $10^7$ Keime |   |    | $10^6$ Keime |   |      |
|--------------|--------------|---|----|--------------|---|------|
|              | A            | B | C  | A            | B | C    |
| 1            | 9,5          | o | 24 | 12,5         | o | 30   |
| 2            | 7            | o | 25 | 11           | o | 32   |
| 3            | 6            | o | 22 | 8            | o | 26   |
| 4            | 4            | o | 17 | 5            | o | 22   |
| 5            | 5            | o | 19 | 7            | o | 22   |
| 6            | 8            | o | 20 | 9            | o | 26   |
| 7            | 3,5          | o | 17 | 5            | o | 20   |
| 8            | 8            | o | 26 | 9            | o | 28   |
| 9            | 5            | o | 20 | 7            | o | 22   |
| 10           | 6            | o | 20 | 8            | o | 25   |
| 11           | -            | - | -  | 1            | o | 12   |
| 12           | -            | - | -  | 2            | o | 15   |
| 13           | 0,5          | o | 7  | 2            | o | 13,5 |
| 14           | 0,5          | o | 7  | 4            | o | 18   |
| 15           | -            | - | -  | 0,5          | o | 7    |
| 16           | 1            | o | 12 | 3            | o | 17   |
| 17           | -            | - | -  | 0,5          | o | 7    |
| 18           | 2            | o | 12 | 3            | o | 18   |
| 19           | 4            | o | 14 | 7            | o | 20   |
| 20           | 0,5          | o | 7  | 4            | o | 13   |

Zeichenerklärung:

- A = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum äußersten Rand der Organprobe bzw. Organsaft
- B = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum festen Organstück
- C = Durchmesser der gesamten wachstumsfreien Zone (in mm)
- = Wachstum nicht beeinflusst
- o = nicht meßbar, da Grenzen zwischen Organsaft und Organzylinder undeutlich

Bei einer Erhöhung der Keimzahl im Testgemisch auf  $10^7$  genügte eine Bebrütung von nur zwei Stunden gegenüber drei Stunden bei  $10^6$  Keimen/ml Agar. Das Testsystem wurde jedoch unempfindlicher, d.h. die Hemmhöfe deutlich kleiner. Bei vier Nieren (Probe Nr. 11, 12, 13, 14) konnte mit  $10^7$  Keimen/ml Agar sogar nicht mehr sicher Hemmstoff nachgewiesen werden (Tabelle 10).

#### d) Verschiedene pH-Werte

##### Hemmung nur bei pH 6,0

Von 83 hemmstoffpositiven Rinder- und Kälbernieren, bei denen der Bac. stearothermophilus-Hemmstofftest im Dreifachansatz mit pH 6,0; 7,0 und 8,0 durchgeführt wurde, verursachten 11 Proben nur bei pH 6,0 eine Wachstumshemmung, das sind 13,3 % der Proben. Im pH-Bereich von 7,0 waren diese Nieren negativ. Der Rest (72 Proben) war sowohl bei pH 6,0 als auch pH 7,0 hemmstoffpositiv. Für pH 8,0 konnte keine Aussage gemacht werden. (Bei Bac. subtilis waren von diesen 11 Nieren sechs ebenfalls nur bei pH 6,0 als hemmstoffhaltig zu erkennen; die restlichen 5 verursachten bei pH 7,0 und 8,0 Hemmhöfe, jedoch bei pH 6,0 die größten)

##### Hemmung nur bei pH 7,0

Zwei Rindernieren der 83 Nierenproben waren im Bac. stearothermophilus-Test nur bei pH 7,0 hemmstoffpositiv, das sind 2,4 % der Proben. Im pH-Bereich von 6,0 waren diese Nieren negativ. Der Rest (81 Proben) war sowohl bei pH 6,0 als auch pH 7,0 hemmstoffpositiv. Für pH 8,0 war keine Aussage zu machen.

##### Hemmung bei pH 8,0

Für diesen pH-Bereich können keine genauen Angaben gemacht werden, da Bac. stearothermophilus bei pH 8,0 nur begrenzt lebensfähig war. Testplatten mit diesem pH-Wert mußten bereits zwei Tage nach der Herstellung deutlich länger bebrütet werden als Platten mit pH 6,0 und 7,0. Vier Tage alte Platten mit pH 8,0 waren überhaupt nicht mehr zu verwenden.

e) Vordiffusion

In Tabelle 11 sind 17 hemmstoffpositive Nieren (Probe Nr. 1 bis 17), 11 hemmstoffpositive Lebern (Probe Nr. 18 bis 28) und 4 hemmstoffpositive Muskelproben (Nr. 29 bis 32) aufgeführt. Das Untersuchungsmaterial wurde, nachdem es auf den Agar gelegt worden war, einmal sofort bei + 63 bis 65°C bebrütet, parallel dazu wurde die Bebrütung bei + 63 bis 65°C erst nach einer Vordiffusion von einer Stunde bei + 2°C durchgeführt.

Tabelle 11: Vergleich von Hemmhofgrößen (in mm) bei direkter Bebrütung und Bebrütung erst nach einer Stunde Vordiffusion

| Probe<br>Nr. | direkt bebrütet |    |    | 1 Stunde Vordiffusion |     |    |
|--------------|-----------------|----|----|-----------------------|-----|----|
|              | A               | B  | C  | A                     | B   | C  |
| 1            | 13              | 14 | 35 | 14                    | 15  | 36 |
| 2            | 9               | 10 | 25 | 9                     | 10  | 25 |
| 3            | 11              | 12 | 29 | 11                    | 13  | 30 |
| 4            | 12,5            | 0  | 30 | 15                    | 0   | 35 |
| 5            | 2               | 0  | 13 | 4,5                   | 0   | 15 |
| 6            | 6,5             | 0  | 18 | 7                     | 0   | 19 |
| 7            | 8,5             | 0  | 22 | 9,5                   | 0   | 24 |
| 8            | 13              | 0  | 31 | 14                    | 0   | 33 |
| 9            | 4               | 0  | 13 | 4                     | 0   | 13 |
| 10           | 12              | 0  | 30 | 14                    | 0   | 33 |
| 11           | 6               | 0  | 20 | 7                     | 0   | 21 |
| 12           | 5               | 0  | 15 | 5,5                   | 0   | 16 |
| 13           | 6               | 0  | 17 | 6                     | 0   | 17 |
| 14           | 8               | 10 | 24 | 9                     | 11  | 25 |
| 15           | 1               | 4  | 14 | 1,5                   | 4,5 | 14 |
| 16           | 2,5             | 5  | 16 | 4                     | 6   | 16 |
| 17           | 3               | 4  | 13 | 3                     | 5   | 15 |
| 18           | 3,5             | 0  | 12 | 4                     | 0   | 13 |
| 19           | 4               | 0  | 13 | 4                     | 0   | 13 |
| 20           | 4               | 0  | 13 | 5                     | 0   | 16 |
| 21           | 3,5             | 0  | 12 | 4                     | 0   | 13 |
| 22           | 5               | 7  | 19 | 6                     | 7   | 19 |
| 23           | 10              | 0  | 25 | 10                    | 0   | 25 |
| 24           | 5               | 6  | 17 | 5                     | 6   | 17 |
| 25           | 5               | 6  | 18 | 5                     | 7   | 20 |
| 26           | 4               | 0  | 17 | 4                     | 0   | 17 |
| 27           | 2               | 5  | 15 | 2,5                   | 0   | 15 |
| 28           | 2               | 4  | 13 | 2                     | 4   | 14 |
| 29           | 4               | 0  | 13 | 4,5                   | 0   | 14 |
| 30           | 6               | 0  | 20 | 9                     | 0   | 23 |
| 31           | 6,5             | 0  | 18 | 7,5                   | 0   | 20 |
| 32           | 6               | 7  | 22 | 7                     | 9   | 24 |

Zeichenerklärung zu Tabelle 11:

- A = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum äußersten Rand der Organproben bzw. Organ-saft
- B = Abstand vom Rand der wachstumsfreien Zone bis zum festen Organstück
- C = Durchmesser der gesamten wachstumsfreien Zone
- o = nicht meßbar, da Grenze zwischen Organsaft und Organzylinder undeutlich

Der Hemmhofgrößenvergleich beider Methoden in Tabelle 11 zeigt, daß die A-Werte bei 18 der 32 Proben gleich geblieben sind bzw. nur um 0,5 mm größer wurden. Von den C-Werten waren 11 gleich groß.

Nur bei vier A-Werten hat die Hemmfläche um 2 mm und mehr nach der Vordiffusion zugenommen.

Bei den C-Werten waren es 11 Proben, bei denen der Hemmhofdurchmesser um 2 mm und mehr zugenommen hatte. Die Vordiffusion von 1 Stunde brachte also keine wesentliche Vergrößerung der Hemmhöfe.

f) Brillantschwarzreduktions (BR)-Teströhrchen

Mit Hilfe der BR-Teströhrchen sollte versucht werden, an Hand eines Farbumschlages eine Beeinflussung des Testkeimes durch die zu untersuchende Probe nachzuweisen. Bei hemmstofffreien Proben sollte der Testkeim wachsen und die blau-violette Oxydationsstufe des Redoxindikators Brillantschwarz in die gelbe Reduktionsstufe überführen. Bei Anwesenheit von Hemmstoff sollte die Reaktion unterbleiben und das Testgemisch seine blau-violette Farbe behalten.

Bei der ersten Versuchsdurchführung - Organzylinder auf die Oberfläche des Agar-Bazillengemisches - führte die Bebrütung bei über 90 % der Proben (Nieren, Lebern und Muskulatur) zu einem Farbumschlag nach Gelb, obwohl die gleichen Proben beim Agardiffusions-

test sowohl mit Bac. subtilis als auch mit Bac. steartophilus (ohne Farbindikator) deutlich hemmstoffpositiv gewesen waren. Der Farbumschlag trat bei den mit hemmstoffpositiven Organproben versehenen Röhrchen 1/2 Stunde früher ein als bei den nicht beschickten Parallelproben. Es war somit nicht möglich, hemmstoffhaltige Organe zu erkennen.

Bei der zweiten Versuchsanordnung - Entfernen des hemmstoffhaltigen Organzylinders nach der Vordiffusion - konnte kein anderes Ergebnis festgestellt werden. Auch hier war es nicht möglich, hemmstoffhaltige Organe sicher zu erkennen.

Bei der dritten Versuchsanordnung, bei der organsaftgetränkte Filterpapierblättchen auf das Agar-Bazillengemisch gelegt wurden, war von 52 hemmstoffpositiven Rinder- und Kälbernieren (mit Bac. subtilis ermittelt) mit den BR-Teströhrchen bei 14 Proben kein Hemmstoff nachweisbar. Bei 7 Nieren war das Ergebnis fraglich (braune Farbe des Testgemisches mit bläulicher Oberfläche), während 31 Nieren ein für Hemmstoff deutlich positives Ergebnis zeigten (blaue Farbe wie vor der Bebrütung oder aber heller, jedoch noch deutlich blau). Ein Zusammenhang zwischen Hemmhofgröße bei Bac. subtilis und der Intensität der blauen Farbe der BR-Teströhrchen konnte nicht festgestellt werden. Es wurden Nieren gefunden, die über 20 mm Hemmhofdurchmesser bei Bac. subtilis verursachten, bei den BR-Teströhrchen jedoch nur eine fragliche Reaktion hervorgerufen hatten (braune Farbe mit bläulicher Oberfläche). Andere Nieren verursachten bei den BR-Teströhrchen keinerlei Farbumschlag (dunkelblaue Farbe), riefen aber bei Bac. subtilis lediglich Hemmhofdurchmesser von 9 mm hervor.

15 hemmstoffnegative Rinder- und Kälbernieren (mit Bac. subtilis ermittelt) waren auch bei den BR-Teströhrchen negativ.

Von 22 hemmstoffpositiven Schweinenieren (mit Bac. subtilis ermittelt) war mit den BR-Teströhrchen bei zwei Proben kein Hemmstoff nachweisbar, bei drei war ein fragliches und bei 17 Proben ein positives Ergebnis abzulesen.

#### 4. Zusammenstellung der Ergebnisse

Die Untersuchungen haben ergeben, daß der Testkeim Bac. subtilis BGA gegenüber Chemotherapeutika-Rein-  
substanzen wie Streptomycin, Chloramphenicol, Neomycin  
und Furazolidon empfindlicher reagierte als Bac. stea-  
rothermophilus var. calidolactis C 953; bei Penicillin  
war es umgekehrt. Chlortetracyclin und Oxytetracyclin  
verursachten bei pH 6 bei beiden Keimen gleichgroße  
Hemmhöfe. Gegen Sulfa-furazol war Bac. stearothermo-  
philus resistent.

Bei hemmstoffhaltigen Nieren von Rindern und Kälbern  
erwiesen sich die beiden Testkeime als nahezu gleich-  
wertig; mit beiden Keimen konnten fast gleichviele  
hemmstoffpositive Proben ermittelt werden. Ebenso zeigte  
der Vergleich der Mittelwerte von Hemmzonen (A-Wert)  
bzw. Hemmhofdurchmesser (C-Wert) - außer dem Hemmhof-  
durchmesser der Rindernieren - keine signifikante  
Differenz.

Bei hemmstoffhaltigen Leber- und Muskulaturproben, die  
von Tieren stammten, deren Nieren sich bei beiden  
Testkeimen als hemmstoffpositiv erwiesen hatten, be-  
stand eine deutliche Überlegenheit von Bac. stearo-  
thermophilus gegenüber Bac. subtilis. Mit ersterem  
Keim wurden mehr hemmstoffhaltige Proben ermittelt;  
außerdem waren die Mittelwerte der Hemmzonen (A-Wert)  
und Hemmhofdurchmesser (C-Wert) der Muskulatur und  
Schweinelebern sowie die Hemmhofdurchmesser der Rin-  
derlebern bei Bac. stearothermophilus signifikant  
größer.

Durch hemmstofffreie Nieren von Rindern und Kälbern  
wurde das Wachstum der beiden Testkeime nicht oder nur  
unwesentlich beeinflußt, so daß die Aussage "hemmstoff-  
negativ" gemacht werden konnte.

Die hemmstofffreien Schweinenieren ließen nur mit Bac.  
subtilis die Aussage "hemmstoffnegativ" zu, nicht je-

doch mit *Bac. stearothermophilus*. Dieser Keim wurde bei allen Proben deutlich im Wachstum gehemmt. Im BGA-Test hemmstofffreie Schweinenieren wurden also beim *Bac. stearothermophilus*-Test immer als "hemmstoffpositiv" angezeigt.

Hemmstofffreie Muskulatur beeinflusste das Wachstum beider Testkeime nicht; bei beiden Keimen konnte die Aussage "hemmstoffnegativ" gemacht werden.

Beim *Bac. stearothermophilus*-Test konnte im Gegensatz zum *Bac. subtilis*-Test nur mit vegetativen Keimen gearbeitet werden, da die Herstellung einer Sporensuspension in genügender Keimdichte zur Durchführung eines Schnelltestes - Ablesen nach 2 bis 3 Stunden - nicht gelang. Außerdem erwies sich *Bac. stearothermophilus* bei + 2°C als nur begrenzt haltbar. Innerhalb einer Woche verminderte sich die Keimzahl wesentlich, so daß eine Woche alte Platten länger bebrütet werden mußten, um deutliche Hemmhöfe erkennen zu können.

Von den beiden Agarschichtdicken bei *Bac. stearothermophilus* erwies sich eine Höhe von 1 mm gegenüber 2 mm als empfindlicher. Bei 1 mm waren die Hemmhofmittelwerte der Nieren und Leberproben signifikant größer als bei 2 mm; außerdem konnten mehr hemmstoffpositive Organe ermittelt werden.

Durch eine Erhöhung der *Bac. stearothermophilus*-Keimzahl von  $10^6$  auf  $10^7$  /ml Agar war es möglich, die Testzeit von 3 Stunden auf 2 Stunden zu senken, jedoch nahm die Empfindlichkeit des Testsystems sowohl gegenüber Antibiotika-Reinsubstanzen als auch hemmstoffhaltigen Organproben wesentlich ab.

Bei dem im Dreifachansatz - pH 6,0; 7,0 und 8,0 durchgeführten *Bac. stearothermophilus*-Test waren von 83 hemmstoffpositiven Rinder- und Kälbernieren 11 Proben (13,3 %) nur bei pH 6,0 hemmstoffpositiv, im pH-Bereich von 7,0 waren diese Nieren negativ. Zwei der 83 Nieren (2,4 %) konnten nur bei pH 7,0 als hemmstoffpositiv ermittelt werden. Bei pH 8,0 konnten keine An-

gaben gemacht werden, da *Bac. stearothermophilus* hier nur begrenzt lebensfähig war.

Durch eine Vordiffusion von 1 Stunde wurden in der Regel nur unwesentlich größere Hemmhöfe erzielt.

Mit Hilfe des bei Milch bewährten Brillantschwarz-  
reduktionstestes konnten von 52 hemmstoffhaltigen  
Rinder- und Kälbernieren nur 31 als deutlich hemm-  
stoffpositiv ermittelt werden (59,6 %); von 22 hemm-  
stoffhaltigen Schweinenieren nur 17, das sind 77,2 %.

## D Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Bei dem Versuch der Erarbeitung eines standardisierbaren mikrobiologischen Schnelltestes zum Hemmstoffnachweis in Organen von Schlachttieren wurde vergleichend zu *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 als Testkeim auch *Bac. subtilis* BGA nach Anweisung des "Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger" (ALTS) eingesetzt, um eine Bezugsgröße zu erhalten. Bei dem ALTS-Test handelt es sich um ein weitgehend standardisierbares und wissenschaftlich erprobtes Verfahren (LEVETZOW, 1971; OBIGER, 1972).

In eigenen Versuchen wurde eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Testkeime gegenüber Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen festgestellt, wobei sich *Bac. stearothermophilus* als ein besonders penicillinempfindlicher Keim erwies. TERPLAN und ZAADHOF (1969) sowie FORSCHNER (1972) stellten dies ebenfalls fest.

Die Ergebnisse mit Streptomycin, Chloramphenicol, Chlortetracyclin sowie Oxytetracyclin, gegen die *Bac. subtilis* empfindlicher bzw. beide Keime gleich empfindlich waren, stehen im Gegensatz zu FORSCHNER (1972), bei dem *Bac. stearothermophilus* gegen Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin empfindlicher reagierte als *Bac. subtilis*.

Eine Erklärung hierfür könnte die geringere Keimeinsaat bei FORSCHNER sein; er verwendete für *Bac. stearothermophilus* nur  $2 \times 10^4$  Keime/ml Agar. In den eigenen Versuchen dagegen betrug die Keimeinsaat  $10^6$ /ml Agar.

GERLACH (1967) und PICHNARCIK et al. (1969) haben bereits auf den Einfluß der Keimmenge beim mikrobiologischen Hemmstofftest hingewiesen. Auch in den eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß durch eine Erhöhung der Keimzahl im Agar der Test unempfindlicher

wird; der Testkeim also erst durch höhere Hemmstoffmengen im Wachstum beeinflusst wird.

Außerdem wurden von FORSCHNER (1972) bei seinen Untersuchungen die zu prüfenden Hemmstoffe primär hemmstofffreier Milch zugesetzt und dann erst untersucht. In den eigenen Versuchen wurden die Reinsubstanzen dagegen direkt auf das Testgemisch gebracht.

Nahezu gleiche Ergebnisse hinsichtlich der Aussage "hemmstoffpositiv" konnten mit hemmstoffhaltigen Nieren von Rindern und Kälbern bei beiden Keimen festgestellt werden. Die Gleichwertigkeit der beiden Testkeime bei hemmstoffhaltigen Nieren zeigte sich auch beim Vergleich der Hemmhofmittelwerte, wo außer dem Hemmhofdurchmesser bei Rindernieren keine signifikante Differenz bestand. Gegenüber Leber- und Muskulaturproben von Rindern, Kälbern und Schweinen, die von Tieren stammten, deren Nieren in beiden Testen hemmstoffpositiv gewesen sind, war *Bac. stearothersophilus* im Vergleich zu *Bac. subtilis* deutlich empfindlicher. *Bac. subtilis* zeigte diese Organe sogar häufig als hemmstoffnegativ an. Unterstrichen wird dieses Ergebnis durch die signifikant größeren Hemmhof- bzw. Hemmhofmittelwerte bei Rinder- und Schweinelebern sowie der Muskelproben bei *Bac. stearothersophilus*. Eine Erklärung hierfür könnte folgende sein:

Die überwiegende Zahl der untersuchten Tiere waren vermutlich mit Penicillin, gegen das *Bac. stearothersophilus* empfindlicher reagierte, behandelt worden. In der Niere reichte die Penicillinkonzentration noch aus, um beide Keime zu hemmen, wobei jedoch bei *Bac. stearothersophilus* ein etwas größerer Hemmhofdurchmesser feststellbar war. Zwischen der Niere und Leber/Muskulatur besteht ein starkes (!) Konzentrationsgefälle der Hemmstoffe, wie WENZEL (1971) bei krankgeschlachteten Tieren - um die es sich auch im vorliegenden Fall handelt - festgestellt hatte. Die in Leber und Muskulatur vorhandene Penicillinmenge reichte dann zwar aus,

Bac. stearothermophilus zu hemmen, nicht mehr jedoch Bac. subtilis.

Die wenigen nicht übereinstimmenden Nierenproben könnten mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Keime gegenüber Chemotherapeutika erklärt werden.

Gleichwertig waren beide Testkeime bei hemmstofffreier Muskulatur sowie hemmstofffreien Nieren von Rindern und Kälbern, nicht jedoch bei hemmstofffreien Schweinenieren. Hier wurde Bac. stearothermophilus var. calidolactis bei sämtlichen Proben deutlich im Wachstum gehemmt. Die Aussage "hemmstoffnegativ" konnte mit diesem Keim folglich bei Schweinenieren nicht gemacht werden, da diese immer als "hemmstoffpositiv" angezeigt wurden; dies schränkt seine Verwendung zum Hemmstoffnachweis bei Schlachttieren erheblich ein. Sehr wahrscheinlich ist die festgestellte Hemmung auf die Wirkung von Lysozym der Niere zurückzuführen, worauf VAN SCHOTHORST (1970) in Verbindung mit Bac. stearothermophilus hingewiesen hat. VAN SCHOTHORST machte jedoch keine tierartlichen Unterschiede. GENMER et al. (1973) fanden in der Niere und Muskulatur von Schweinen hemmende Substanzen, die den Bac. subtilis-Test geringgradig beeinflussen. Dies kann durch die eigenen Versuche bei den Nieren bestätigt werden, nicht jedoch für die Muskulatur. Auch Bac. subtilis wurde durch hemmstofffreie Nieren in einigen Fällen geringgradig beeinflusst. Da die Hemmzonen jedoch unter 1 mm waren, konnte die Aussage "hemmstoffnegativ" gemacht werden.

Zu prüfen bliebe, inwieweit andere Bac. stearothermophilus-Stämme unempfindlicher gegen originäre Körperhemmstoffe sind. So reagierten bei ASHTON und BUSTA (1968) z.B. 10 verschiedene Bac. stearothermophilus-Stämme unterschiedlich auf rohe Milch.

Bac. stearothermophilus erfuhr eine weitere Einschränkung, da dieser Keim, im Gegensatz zu Bac. subtilis, nur in der vegetativen Form eingesetzt werden konnte. Bei der Durchführung des allgemeinen Hemmstofftestes

ist jedoch nach PICHNARCIK et al. (1969) die Standardisierung zu fordern. Diese ist u.a. von einer konstanten Keimzahl im Testgemisch abhängig, die aber nur durch die Verwendung von Sporen gesichert ist (KUNDRAT, 1968).

Ebenfalls nur mit vegetativen Formen von *Bac. stearothermophilus* arbeiteten TERPLAN und ZAADHOF (1969), VAN SCHOTHORST (1970) und FORSCHNER (1972). KRAACK und TOLLE (1969) arbeiteten mit lyophilisierten Testkulturen. KUNDRAT (1972) verwendete zwar Sporen, mußte aber das Testsystem zur Erlangung einer genügenden Keimkonzentration vor Testbeginn vorbebrüten; folglich befand sich der Keim dann auch in der vegetativen Form.

Gegen eine leichte Standardisierbarkeit des *Bac. stearothermophilus*-Testes sprechen auch die in der Literatur angegebenen unterschiedlichen Testzeiten, die von 45 Minuten bei KUNDRAT (1972) über 2 bis 3 Stunden bei VAN SCHOTHORST (1970) bis zu 5 bis 6 Stunden bei EBRECHT und SEIFERT (1972) reichen. Im Gegensatz dazu bestehen beim *Bac. subtilis*-Test einheitliche Angaben von 16 bis 18 Stunden (MANTEL, 1971; HEILMANN, 1971; ROTH, 1971; SCHAAL und WENZEL, 1972; u.a.).

Weitere Nachteile von *Bac. stearothermophilus* sind seine Resistenz gegen Sulfa-furazol, die bei *Bac. subtilis* nicht beobachtet wurde sowie seine geringe Haltbarkeit bei + 2°C. Nach einer Woche Lagerung des Testsystems mußte deutlich länger bebrütet werden. Durch Vermehrung des Testkeimes auf festen Nährböden (FORSCHNER, 1973) wäre dieser Nachteil zu beseitigen. Die an sich gute Haltbarkeit bei - 20°C konnte jedoch nicht ausgenutzt werden, da sich bei dieser Temperatur die Struktur des Agars so veränderte, daß Hemmhöfe nicht mehr deutlich ablesbar waren.

Zu den nur in Zusammenhang mit *Bac. stearothermophilus* überprüften Faktoren kann gesagt werden, daß eine Vergrößerung der Agarschichtdicke auf 1 mm das Testsystem

deutlich empfindlicher gemacht hat.

KISSLING (1959), PICHNARCIK et al. (1969) und TERPLAN und ZAADHOF (1969) haben in Verbindung mit anderen Testkeimen, sowie FORSCHNER (1973) in Verbindung mit *Bac. stearrowthermophilus*, ebenfalls auf den Zusammenhang von Agarschichtdicke und Zunahme der Testempfindlichkeit bei Abnahme der Schichtdicke hingewiesen. Für die Praxis muß jedoch eine Schichthöhe von 2 mm empfohlen werden, da diese Schichtdicke leichter und vor allen Dingen auch gleichmäßiger ausgegossen werden kann. Ebenfalls 2 mm wurden von PICHNARCIK et al. (1969) sowie vom Bundesgesundheitsamt (1972) beim *Bac. subtilis*-Test empfohlen.

Durch Verwendung verschiedener Keimkonzentrationen im Agar konnte gezeigt werden, daß die Testzeit direkt von der Keimzahl bei Testbeginn abhängig ist. Als empfehlenswert für *Bac. stearrowthermophilus* haben sich  $10^6$  Keime/ml Agar und eine Bebrütung von 3 bis 4 Stunden bei + 63 bis 65°C erwiesen. Höhere Keimkonzentrationen machten das Testsystem zwar schneller ablesbar, jedoch auch unempfindlicher gegen Hemmstoffe.

Fast die gleiche Keimkonzentration empfehlen TERPLAN und ZAADHOF (1969), nämlich  $5 \times 10^6$ /ml Agar und 3 1/2 bis 4 Stunden Bebrütung.

Geringere Konzentrationen benutzten VAN SCHOTHORST (1970), KUNDRAT (1972) sowie FORSCHNER (1973). Die Autoren empfehlen Konzentrationen von  $10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Keime/ml Agar, wobei die Bebrütungszeiten von 2 bis 5 Stunden reichen.

Der pH-Wert ist beim biologischen Hemmstofftest (*Bac. subtilis*-Test) nach PICHNARCIK et al. (1969) sowie GISSKE et al. (1970) von Bedeutung, da Antibiotika unterschiedliche pH-Optima besitzen. Die eigenen Ergebnisse zeigen, daß auch beim *Bac. stearrowthermophilus*-Test der Doppelansatz mit pH 6,0 und 7,0 erfolgen muß. Die an sich wünschenswerte Durchführung bei pH 8,0 stieß auf Schwierigkeiten, da der Keim in diesem Bereich zu schnell abstarb. SCHAAL und WENZEL

(1972), die nur bei pH 6,0 ein auswertbares Wachstum feststellen konnten, lehnen *Bac. stearrowthermophilus* aus diesem Grund als Testkeim ab.

Von KUNDRAT (1968, 1972) und von VAN SCHOTHORST (1970) wurden verschiedene pH-Werte, d.h. der Doppelansatz beim *Bac. stearrowthermophilus*-Test, nicht berücksichtigt. KUNDRAT schreibt einen pH-Wert von 7,0 bis 7,2 bei + 65°C vor, VAN SCHOTHORST macht keine Angaben.

In den eigenen Versuchen wurde eine Vordiffusion von nur einer Stunde gewählt. Die sonst übliche Vordiffusion von 3 bis 4 Stunden (BONFERT und BERRANG, 1969; MEYER et al., 1969; PICHNARCIK et al., 1969; SCHAPER, 1970) wurde nicht durchgeführt, weil der Test möglichst schnell ablesbar sein sollte. Da durch diese Vordiffusion in der Regel nur unwesentlich größer Hemmhöfe erzielt wurden, kann auf eine Vordiffusion verzichtet werden. Zu gleichen Ergebnissen kam auch FORSCHNER (1973).

Der Schnelltest mit *Bac. stearrowthermophilus* var. *calidolactis* könnte zum Nachweis von Hemmstoffen bei Rindern und Kälbern - wobei die Beurteilung bereits nach 3 Stunden erfolgen kann - sowie auch noch für Leber- und Muskelproben vom Schwein, nicht dagegen jedoch bei Schweinenieren, die in jedem Fall - ob hemmstoffhaltig oder hemmstofffrei - ein hemmstoffpositives Ergebnis aufwiesen, eingesetzt werden. Gerade Nieren sind jedoch für den Hemmstoffnachweis beim Schlacht tier, insbesondere bei Krankschlachtungen, das geeignetste Organ (KOTTER et al., 1959; FORSCHNER, 1962; BONFERT und BERRANG, 1969; WENZEL, 1971).

Der Einsatz des *Bac. stearrowthermophilus*-Testes könnte also mit den beschriebenen Einschränkungen in folgender Form erfolgen:

- a) Vermehrung von *Bac. stearrowthermophilus* var. *calidolactis* C 953 in Hefeextrakt-Trypton-Dextrose-

- Bouillon bei + 63 bis 65°C, bzw. aufgrund neuerer Arbeiten (FORSCHNER, 1973) auf festen Nährböden
- b) Agarkeimsuspension mit einer Dichte von ca.  $10^6$  Keime/ml
  - c) Agarschichtdicke von 2 mm
  - d) Doppelansatz mit pH 6,0 und 7,0
  - e) Auflegen eines Organzylinders von 5 mm Durchmesser und 3 mm Höhe
  - f) Bebrütung für ca. 3 Stunden bei + 63 bis 65°C
  - g) Bewertung einer Hemmzone von mindestens 1 mm als positiv

Die ausführliche Methodik des Bac. *stearothermophilus*-Testes ist aus dem Kapitel C "Eigene Untersuchungen" ersichtlich und zwar unter I Material auf Seite 40 und II Methodik auf Seite 42.

Der für den Hemmstoffnachweis in Milch bewährte Brillantschwarzreduktions (BR)-Test erwies sich für die Untersuchung von Nieren als unbrauchbar, da hemmstoffhaltige Proben nicht sicher als hemmstoffpositiv angezeigt wurden.

In den Untersuchungen erwies sich Bac. *subtilis* Stamm BGA, als Testkeim zum Nachweis von Hemmstoffen als der geeignetere Keim, da hemmstoffhaltige Nieren sicher als "hemmstoffpositiv" und hemmstofffreie Nieren sicher als "hemmstoffnegativ" angezeigt wurden. Bac. *subtilis* zeichnet sich durch eine ausreichende Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika aus; ausserdem ist der Test durch die Verwendung von Sporen leicht zu standardisieren. Als Nachteil ist die mit 18 Stunden gegenüber Bac. *stearothermophilus* erheblich längere Dauer dieses Testes anzusehen.

Nachdem aber Bac. *stearothermophilus* für den Nachweis von Hemmstoffen in Nieren vom Schwein nicht eingesetzt

werden kann und in der Routine-Diagnostik die gleichzeitige Anwendung von 2 verschiedenen Test-Verfahren nicht praktikabel ist, muß *Bac. subtilis* für die Durchführung des allgemeinen Hemmstofftestes als Testkeim der Vorzug gegeben werden.

Von der am allgemeinen Hemmstofftest (*Bac. subtilis*-Test) geübten Kritik, wie Beeinflussung desselben durch körpereigene physiologische Hemmstoffe, unspezifische Hemmung durch Fäulnisprodukte, Hemmung durch antibakterielle Substanzen in Pflanzen, Beeinflussung durch nutritive Antibiotikazusätze, Nichtansprechen auf eine Reihe von Antibiotika (z.B. Chloramphenicol) und schließlich das Unvermögen der Aussage über Art und Menge des Antibiotikums, kann nach Literaturangaben nur der letzte Punkt aufrecht erhalten werden (OBIGER, 1963; WELZ, 1967; MEYER et al., 1969; MANTEL, 1971; ROTH, 1971; BECK und MANTEL, 1972; GEMMER et al., 1973). Für Reihenuntersuchungen am Schlachttier ist der allgemeine Hemmstofftest unter Verwendung von *Bac. subtilis* dank seiner Einfachheit z.Z. nicht durch andere Nachweisverfahren zu ersetzen. In Zweifelsfällen stehen aufwendigere Methoden wie z.B. chemische bzw. physiko-chemische (LANGNER und TEUFEL, 1972), chemisch-mikrobiologische (ROTH, 1971; LANGNER et al., 1973) oder auch kompliziertere mikrobiologische Verfahren (VAN SCHOTHORST, 1970) zur Differenzierung der Hemmstoffe zur Verfügung.

## E Zusammenfassung

Zur Klärung der Frage, ob für die Feststellung von Hemmstoffen bei Schlachttieren die Möglichkeit eines Schnelltestes besteht, wurden neben Antibiotika- und Chemotherapeutika-Reinsubstanzen nachstehende 643 Proben vergleichend dem Hemmstofftest unter Verwendung von *Bac. stearoothermophilus* var. *calidolactis* C 953 - Bebrütung 2 bis 3 Stunden bei + 63° bis 65°C - und *Bac. subtilis*, Stamm BGA - Bebrütung 18 Stunden bei + 30°C - unterzogen:

- a) 201 hemmstoffpositive Nieren von not- bzw. krankgeschlachteten Rindern, Kälbern und Schweinen  
= 201 Proben
- b) 124 Leber- und 33 Muskelproben von Rindern, Kälbern und Schweinen, deren Nieren hemmstoffpositiv waren  
= 157 Proben
- c) 165 hemmstofffreie Nieren von normalgeschlachteten Rindern, Kälbern und Schweinen  
= 165 Proben
- d) 120 hemmstofffreie Muskelproben von not- bzw. krankgeschlachteten Rindern, Kälbern und Schweinen  
= 120 Proben  
= 643 Proben

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Schnelltest mit *Bac. stearoothermophilus* var. *calidolactis* C 953 eignet sich zum Nachweis von Hemmstoffen in Niere, Leber und Muskulatur von Rind und Kalb. Während mit dem Verfahren auch Hemmstoffe in Leber und Muskulatur vom Schwein nachweisbar sind, versagt der Test bei Nieren vom Schwein, da auch sicher hemmstofffreie Schweinenieren ausnahmslos als "hemmstoffpositiv" angezeigt werden.

2. Die für den allgemeinen Hemmstofftest erforderliche Verwendung von Sporen stieß bei dem hier verwendeten *Bac. stearoothermophilus*-Stamm auf Schwierig-

keiten, da die zur Durchführung eines Schnelltestes erforderliche Sporendichte nicht erreicht werden konnte.

3. Beim Bac. stearothermophilus-Test waren mit einer Agarschichtdicke von 1 mm im Gegensatz zu 2 mm mehr hemmstoffpositive Proben zu erkennen.

4. Durch eine Erhöhung der Bac. stearothermophilus-Keimkonzentration von  $10^6$  auf  $10^7$ /ml Agar konnte die Testzeit von 3 auf 2 Stunden reduziert werden; das Testsystem reagierte jedoch weniger empfindlich auf Hemmstoffe.

5. Eine Vordiffusion von einer Stunde hatte gegenüber einer direkten Bebrütung keinen wesentlichen Einfluß auf die Aussagekraft des Bac. stearothermophilus-Testes.

6. Die Methodik zur Durchführung des Schnelltestes ist im Kapitel "Besprechung der Ergebnisse und Diskussion" auf Seite 87 enthalten.

7. Bac. subtilis, Stamm BGA, erwies sich als Testkeim für den Hemmstoffnachweis bei Rind, Kalb und Schwein als gleichgut brauchbar.

Da bei diesem Test weder falschpositive noch falsch-negative Ergebnisse auftraten, ist Bac. subtilis - trotz längerer Untersuchungszeit - gegenüber Bac. stearothermophilus als Testkeim der Vorzug für den allgemeinen Hemmstofftest zu geben.

8. Die Verwendung von Brillantschwarzreduktions-Teströhrchen kann zum Nachweis von Hemmstoffen bei Schlachtieren nicht empfohlen werden, da hemmstoffhaltige Organe nicht sicher als hemmstoffpositiv angezeigt werden.

F. Literaturverzeichnis

1. ASHTON, D.H. and BUSTA, F.F. 1968. Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus*  
J. Dairy Sci. 51, 842 - 847
2. BARTELS, H., ANGERSBACH, H. und KLARE, H.J. 1972  
Nachweis von Hemmstoffen bei Tieren aus Normal-  
schlachtungen  
Fleischwirtschaft 52, 479 - 482
3. BARTELS, K.H. 1970. Hemmstoffe auch bei Normal-  
schlachtungen?  
Schlacht- u. Viehhof-Ztg. 70, 309 - 312
4. BECK, G. und MANTEL, TH. 1972. Der biologische  
Hemmstofftest, ein Weg zur Klärung des Rück-  
standproblems in Fleisch  
Fleischwirtschaft 52, 1605 - 1609
5. BERNAERTS, M.J. 1956. Über den unspezifischen  
Nachweis von Konservierungsmitteln in Marmela-  
den mittels osmophiler Hefen  
Z. Lebensm.-Unters. 104, 405 - 412
6. BISPING, W. 1962. Die Kehrseite der Antibiotika-  
therapie aus der Sicht der Veterinärmedizin  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69, 495 - 498
7. BLYTH, M.W. 1901. Detection and estimation of  
preservatives in milk  
Analyst 16, 148 - 151
8. BONFERT, W. und BERRANG, K. 1969. Hemmstoffnach-  
weis im Rahmen der bakteriologischen Fleisch-  
untersuchung  
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 61 - 63
9. BREED, R., MURRAY, E. and SMITH, N. 1957. Bergey's  
Manual of Determinative Bacteriology  
7. Auflage Baltimore
10. BRÜGGEMANN, J. 1955. Über die Anwendung der Anti-  
biotika in der Tierernährung  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 62, 14 - 16
11. BRUNN, H.J. 1971. Untersuchungen über die Anwen-  
dung einiger Nachweismethoden zur Feststellung  
von Antibiotika in Milch  
Vet.med.Diss. Gießen
12. BULLING, E., STEPHAN, P. und SEBEK, V. 1971. Über-  
tragbare Antibiotikaresistenz bei Salmonellen  
14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der DVG  
1971 in Freiburg, Tagungsbericht S. 65 - 75

13. BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG 1969. Die hygienische Wertigkeit der Rohmilch und Empfehlungen zu ihrer weiteren Verbesserung  
Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber. Bd. 21,  
201 - 356
14. CORETTI, K. 1959. Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen in Gelatine  
Fleischwirtschaft 11, 737 - 739
15. CORETTI, K. 1961. Nachweis von Antibiotika in Fleischwaren  
Fleischwirtschaft 13, 119 - 122
16. DRAGON, G. 1958. Ein Beitrag zur Ermittlung von Hemmstoffen in der Trinkmilch mittels Tetrazoliumsals als Indikator und die Möglichkeit ihrer weiteren Differenzierung mit Hilfe des Kluyver-Gärungstest  
Milchwiss. 13, 304 - 314
17. DRIEUX, H. et THIERY, J.P. 1944. La recherche des antiseptiques dans les boites de conserves  
Bull. Acad. Vet. France 17, 89 - 90
18. EBRECHT, A. und SEIFERT, H.S.H. 1972. Versuch zum intra vitam Nachweis von Hemmstoffen bei Schlacht-  
tieren, vorläufige Mitteilung  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 216 - 221
19. FORSCHNER, E. 1962. Hemmstoffe in Organen von Schlacht-  
tieren  
Arch. Lebensmittelhyg. 13, 242 - 246
20. FORSCHNER, E. 1972. Rationalisierungsmöglichkeiten beim Nachweis von Hemmstoffen in Milch im Agardiffusionsverfahren  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 101 - 104
21. FORSCHNER, E. 1972. Vergleichende Untersuchungen des Agar-Diffusionstestes auf der Basis des Bac. stearothermophilus var. calidolactis mit anderen gebräuchlichen Hemmstoffnachweisverfahren für Milch  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 146 - 150
22. FORSCHNER, E. 1973. Das Agardiffusionssystem mit Bac. stearothermophilus var. calidolactis als Testkeim zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch  
Ein Standardisierungsvorschlag  
Arch. Lebensmittelhyg. 24, 108 - 114
23. GALESLOOT, TH.E. und LABOTS, H. 1959. Over de bacteriologie van gesteriliseerde melk en melkprodukten  
Neth. Milk Dairy 13, 16 - 37

24. GALESLOOT, TH.E. und LABOTS, H. 1959. Thermofiele sporevormers in melk vooral met betrekking tot de bereiding van gesteriliseerde melk en chocolademelk  
Neth. Milk Dairy 13, 155 - 179
25. GALESLOOT, TH.E. und HASSING, F. 1962. Een snelle en gevoelige methode om met papierschijfjes penicilline in milk aan te tonen  
Neth. Milk Dairy 16, 89 - 95
26. GARTSIDE, R.N. 1960. The detection of antibiotics in canned meats  
Vortrag gehalten am 23.3.1960 für Food Group of the Society of Chemical Industry, London, zit. nach Käferstein Vet. med. Diss. Gießen 1964
27. GEMMER, H. und SEEGER, H. 1970. Der Nachweis von Hemmstoffen in der bakteriologischen Fleischuntersuchung und seine Bedeutung für den Verbraucher  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 577 - 600
28. GEMMER, H.; SEEGER, H. und HAASE, M. 1973. Veterinärmedizinische Beiträge zum Umweltschutz  
Die Blauen Hefte für den Tierarzt 50, 529 - 542
29. GERLACH, H. 1967. Zur Resistenztestung gegen Antibiotika und Sulfonamide  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 80, 231 - 234
30. GERLACH, H. 1972. Salmonellen in der L-Form bei Tauben  
Vortrag auf der Tagung der Fachgruppe : Geflügelkrankheiten, Virologie, Bakteriologie, Antigene und Immunantwort beim Huhn. Berlin 6.u. 7. April 1972
31. GISSKE, W.; WENZEL, S.; PICHNARCIK, J.; SCHAPER, J. und ENNEN, E. 1970. Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei normal geschlachteten, tauglich beurteilten Kälbern, Schweinen und Rindern  
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 25 - 30
32. GROSSKLAUS, D. 1970. Rückstandsprobleme vom Nutztier bis zum Lebensmittel  
Festvortrag. 13. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene in Saarbrücken.
33. GROSSKLAUS, D. 1971. Rückstände im Fleisch, Vorkommen und Bedeutung sowie ihre Beurteilung im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung  
Bundesgesundheitsblatt 14, 205 - 211

34. HAPKE, H.J. 1970. Unbeabsichtigte Arzneimittelwirkungen  
Tierärztl. Umschau 25, 163 - 169
35. HEILMANN, R. 1971. Ringuntersuchung auf Hemmstoffe (Antibiotika) bei normal geschlachteten Rindern, Schweinen und Kälbern an 11 Schlachthöfen in der Bundesrepublik Deutschland  
Vet. med. Diss. Hannover
36. HELWIG, H. 1973. Antibiotika - Chemotherapeutika, Grundlagen - Anwendung - Gefahren  
Georg Thieme Verlag Stuttgart
37. KÄFERSTEIN, F.K. 1964. Nachweis und Bedeutung des Vorkommens von Antibiotika im Fleisch von Schlachttieren  
Vet. med. Diss. Gießen
38. KEWITZ, H. 1967. Tierärztliche Verantwortung bei der Anwendung von Arzneimitteln  
Deutsches Tierärzteblatt 15 Sonderteil, 21 - 24
39. KIRCHGESSNER, M. und FRISECKE, H. 1967. Antibiotika in der praktischen Tierernährung  
Mitt. f. die Tierhaltung 106, 3 - 18
40. KISSLING, R. 1959. Über den biologischen Nachweis von Antibiotika in Geweben  
Wien. tierärztl. Mschr. 46, 466 - 472
41. KLEIN, D. 1972. Der Hemmstoff- und Hormonnachweis bei Schlachttieren  
Tierärztl. Umschau 27, 24 - 28
42. KLEINSCHROTH, E. und KRAACK, J. 1969. Der Brillantschwarz-Reduktionstest im BMR-System zur Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe  
Deutsche Molk.-Ztg. 45, 2244 - 2245
43. KLIMA, H. 1966. Zur Frage des Hemmstoffnachweises anlässlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung  
Fleischwirtschaft 46, 1347 - 1349
44. KLUYVER, A.J. 1914. Biochemische Suikerbepalingen  
Diss. Univ. Delft; (zit. nach Mossel, 1956)
45. KNOTHE, H. 1967. Antibiotische Stoffe in der Tierhaltung und mögliche Rückwirkungen auf den Menschen im Hinblick auf Allergie und Bakterienresistenz  
Deutsches Tierärzteblatt 15, Sonderteil, 26 - 29

46. KNOTHE, H. 1971. Übertragbare Arzneimittelresistenz bei apathogenen und pathogenen Darmbakterien  
14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der DVG  
1971 in Freiburg, Tagungsbericht S. 59 - 64
47. KOTTER, L., TERPLAN, G. und SCHULZ, H. 1959. Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft  
Arch. Lebensmittelhyg. 10, 145 - 152
48. KOTTER, L. 1960. Einschaltung eines biologischen Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung  
Fleischwirtschaft 12, 188 - 189
49. KRAACK, J. und TOLLE, A. 1967. Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch  
Milchwiss. 22, 669 - 673
50. KRAACK, J. und TOLLE, A. 1969. Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest  
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145 - 149
51. KRETZER, K. 1962. Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft mit Hilfe des Katalase-Testes  
Vet. med. Diss. München
52. KUNDRAT, W. 1968. Methoden zur Bestimmung von Antibiotika-Rückständen in tierischen Produkten  
Z. analyt. Chemie 243, 624 - 630
53. KUNDRAT, W. 1972. 45 - Minuten-Schnellmethode zum mikrobiologischen Nachweis von Hemmstoffen in tierischen Produkten  
Fleischwirtschaft 52, 485 - 487
54. KUSCHINSKY, G. und LÜLLMANN, H. 1972. Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie  
5. Auflage Verlag Georg Thieme, Stuttgart
55. LANGNER, H.J. und TEUFEL, U. 1972. Der chemische und mikrobiologische Nachweis von Antibiotika, 1. Mitteilung  
Fleischwirtschaft 52, 1610 - 1614
56. LANGNER, H.J.; TEUFEL, U.; SIEGER, M. und FROMMHOFF, M. 1973. Der chemische und mikrobiologische Nachweis von Antibiotika, 2. Mitteilung  
Fleischwirtschaft 53, 243 - 249

57. LENDLE, L. 1962. Arzneimittelnebenwirkungen in der Kritik der Pharmakologie  
Münch. med. Wschr. 104, 61 - 67
58. LEVETZOW, R. 1971. Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU)  
Bundesgesundheitsblatt 14, 211 - 213
59. LORENZ, P. 1967. Anwendung und Auswertung des Antibiotikatestes in der Bakteriologischen Fleischuntersuchung  
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 30 - 32
60. MANTEL, TH. 1971. Ergebnisse von Untersuchungen nach einer einheitlichen Untersuchungsmethode zum Nachweis von Hemmstoffen in Nieren bei Schlachttieren  
14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der DVG 1971 in Freiburg, Tagungsbericht S. 95 - 100
61. MATTICK, L.R.; ANDERSON, E.O. and WILDASIN, H.L. 1955. A quantitative procedure for the determination of an inhibitory substance in milk-Penicillin  
J. Dairy Sci. 38, 829 - 834
62. MEYER, B., THIEL, W. und WEIS, W. 1969. Bedeutung und Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung  
Fleischwirtschaft 49, 203 - 206
63. MOSSEL, D.A.A. und de BRUIN, A.S. 1953. The detection of preservatives in beverages by a fermentation test, with special reference to brominated compounds  
Analyst 78, 37 - 42
64. MOSSEL, D.A.A. 1956. Aufgaben und Durchführung der modernen hygienischbakteriologischen Lebensmittel-Überwachung  
Wien. tierärztl. Mschr. 43, 321 - 340, 596 - 610
65. NASSAL, J. und NIEPER, L. 1971. Hemmstoffnachweis bei der Bakteriologischen Fleischuntersuchung im Raume Nordbaden  
Tierärztl. Umschau 26, 580 - 582
66. NEAL, C.E. and CALBERT, H.E. 1956. The use of tetrazolium salts as indicators for lactic starter inhibitory substances  
4. Internat. Dairy Congress Proceedings Rom 1956, Vol. 2, Part II 359 - 366

67. OBERZILL, W. 1962. Die Antibiotika, Bd. I, Teil I  
Verlag Hans Carl, Nürnberg
68. OBIGER, G. 1963. Hemmstoffe in der Anlieferungs-  
milch und Methoden zu ihrem Nachweis  
Arch. Lebensmittelhyg. 14, 10 - 19
69. OBIGER, G. 1970. Das Problem der Fremd- und Wirk-  
stoffe in Rohmilch sowie ihrer Ermittlung-Betrachtung zum Hemmstoffnachweis mit dem Brillant-  
schwarz-Reduktionstest  
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 209 - 217
70. OBIGER, G. 1972. Grundsätzliche Bemerkungen des  
Bundesgesundheitsamtes zum allgemeinen Hemm-  
stofftest (zugleich eine kritische Stellung-  
nahme zu den in letzter Zeit vorgetragenen Ein-  
wänden)  
Bundesgesundheitsamt 31.7.1972
71. PICHNARCIK, J., WENZEL, S. und GISSKE, W. 1969.  
Beiträge zur Methodik des Hemmstoffnachweises  
in Organen und Muskulatur von Schlachttieren  
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 272 - 279
72. PIENING, H. 1962. Vergleich biologischer Metho-  
den zum Nachweis von Hemmstoffen in Schweine-  
nieren  
Vet. med. Diss. München
73. PRÄNDLE, O. 1973. Auswirkungen der Anwendung von  
Antibiotika beim Tier auf die hygienische Be-  
schaffenheit der vom Tier stammenden Lebens-  
mittel  
Arch. Lebensmittelhyg. 24, 64 - 66
74. RACKOW, H.G. und WELZ, W. 1964. Weitere Ergeb-  
nisse und Erfahrungen mit einem Hemmstofftest  
bei Milchuntersuchungen  
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 49 - 53
75. ROTH, L. 1971. Vergleich der quantitativen und  
qualitativen Aussagefähigkeit des allgemeinen  
mikrobiologischen Hemmstofftestes mit dem  
mikrobiologisch-chemischen Antibiotikanachweis-  
verfahren bei normalgeschlachteten Schweinen,  
Kälbern und Rindern  
Vet. med. Diss. Hannover
76. SCHAAL, M. 1961. Erfahrungen über den mikrobi-  
ologischen Hemmstoffnachweis bei Geflügelfleisch  
Fleischwirtschaft 13, 561 - 563

77. SCHAAL, M. und WENZEL, S. 1972. Die Empfindlichkeit von Testkeimen gegenüber verschiedenen Antibiotikareinsubstanzen als Grundlage für den Nachweis von Hemmstoffen in Muskulatur und Organen mit dem allgemeinen Hemmstofftest (AH-Test)  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 189 - 194
78. SCHAPER, J. 1970. Hemmstoffnachweis (Antibiotika) bei normal- und krankgeschlachteten Rindern, Kälbern und Schweinen  
Vet. med. Diss. Hannover
79. SCHMIDT, U. und WOLTERS DORF, W. 1972. Antibiotika in Frischfleisch und Fleischerzeugnissen  
Kulmbacher Woche 1972 vom 9.- 12.10.1972 der Bundesanstalt für Fleischforschung, Tagungsbericht S. 37 - 39
80. SCHRAUDY, E. und RAUSCHER, W. 1972. Ein Beitrag zum Nachweis von Antibiotika in der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 117 - 121
81. SCHOTHORST, M. van 1969. Residuen van antibiotika in slachtdieren  
Vet. med. Diss. Utrecht
82. SCHOTHORST, M. van 1970. Nachweis und Identifizierung einiger Antibiotika bei Schlachttieren  
Fleischwirtschaft 50, 1085 - 1087
83. SCHOTHORST, M. van 1971. Bestimmung und Beurteilung von Antibiotika-Rückständen in Schlachtieren  
14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der DVG 1971 in Freiburg, Tagungsbericht S. 80 - 87
84. SCHULZ, H. 1962. Ein Schnellnachweis für Hemmstoffe in Lebensmitteln tierischer Herkunft auf der Basis von TTC  
Vet. med. Diss. München
85. SEELEMAN, M. und OBIGER, G. 1963. Antibiotika und die aus ihrer Anwendung für die Milchwirtschaft sich ergebenden Probleme  
Milchwissenschaft 18, 462 - 469
86. SINELL, H. J. 1967. Auswirkungen der Arzneianwendung auf die Lebensmittel- und Milchhygiene  
Deutsches Tierärzteblatt 15, Sonderteil, 30 - 32

87. SPROCKHOFF, H. v. 1960. Zum Nachweis von Antibiotika in der Niere von Schlachttieren bei der Bakteriologischen Fleischuntersuchung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 67, 620 - 622
88. STAATSANZEIGER FÜR BADEN-WÜRTTEMBERG 1973. Rückstände von Arzneimitteln im Fleisch  
22 Nr. 19
89. TAKACS, J. and KOVACS, S. 1969. Demonstration of antibiotics residues in the meat of slaughtered animals  
Acta. vet. Acad. Sci. Hung. 19, 11 - 19
90. TERPLAN, G. 1960. Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Fleischkonserven  
Arch. Lebensmittelhyg. 11, 37 - 38
91. TERPLAN, G. und ZAADHOF, K.J. 1969. Der Nachweis von Hemmstoffen in der Milch mit Bacillus stearothermophilus var. calidolactis im Agardiffusionstest und TTC-Schnelltest  
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 279 - 284
92. TERPLAN, G., ZAADHOF, K.J. und MATTHEIS, A. 1972. Erhebungen über das Vorkommen von Antibiotika in der Anlieferungsmilch  
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 29 - 34
93. THIEL, W. 1973. Neue Methoden zum Nachweis gesundheitsschädlicher Rückstände in vom Tier stammenden Lebensmitteln  
Fleischwirtschaft 53, 233 - 234
94. THIER, E. 1972. Hemmstofftest in der Fleischschau unzuverlässig.  
Kraftfutter S. 356
95. TSCHEUSCHNER, I. 1972. Anaphylaktische Reaktion auf Penicillin nach Genuß von Schweinefleisch  
Z. Haut-Geschl. Kr. 47 (14), 591 - 592
96. WALTER, A.M. und HEILMEYER, L. 1965. Antibiotika-Fibel  
Georg Thieme Verl. Stuttgart
97. WELZ, W. 1961. Beitrag zur Methodik biologischer Hemmstoffteste in Milch  
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 196 - 198
98. WELZ, W. 1967. Zur Frage einer möglichen Beeinflussung des Hemmstoffnachweises im Rahmen der Bakteriologischen Fleischuntersuchung durch in Pflanzen vorkommende antibakterielle Wirkstoffe  
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 230 - 231

99. WENZEL, S. 1971. Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei krankgeschlachteten Rindern und Schweinen und ein Vergleich mit den Hemmstoffnachweisen bei normal geschlachteten Tieren  
Arch. Lebensmittelhyg. 22, 200 - 205
100. WINTER, A.G. 1952. Die Heilpflanzen des Matthiolus (1611) gegen Infektionen der Harnwege und Verunreinigungen der Wunden bzw. zur Förderung der Wundheilung im Lichte der Antibiotikaforschung  
Madaus Jahresbericht VI, 7 - 42
101. ZAADHOF, K.J. 1971. Über die Eignung von mikrobiologischen Nachweisverfahren für Hemmstoffe in Milch  
14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der DVG 1971 in Freiburg, Tagungsbericht S.107 - 113
102. ZEITTRÄGER 1970. Zum biologischen Nachweis aus Futterpflanzen stammender Hemmstoffe in der Milch  
Vet. med. Diss. Hannover

Herrn Professor Dr. H. Bartels, Direktor des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus Liebig-Universität Gießen, möchte ich für die Übernahme des Themas sowie für wichtige Anregungen und Hinweise herzlich danken.

Ebenso danke ich Herrn Reg.Vet.Direktor Priv.-Doz. Dr. J. Nassal, Leiter des Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamtes Heidelberg, für seine stets gewährte Unterstützung und Förderung der vorliegenden Arbeit.

Für die Durchsicht der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. R. Hadlok vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus Liebig-Universität Gießen, sowie besonders herzlich Herrn Ob.Reg.Vet. Rat Dr. H. Heinert vom Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg, danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamtes Heidelberg für ihre stete Hilfsbereitschaft.

### Lebenslauf

Am 22. April 1942 wurde ich, Jürgen Dieter Fleck, als Sohn des Dipl. Ing. Robert Fleck und seiner Ehefrau Hildegard Fleck, geb. Nauen, in Frankfurt/M. geboren.

Ostern 1949 wurde ich in Schlitz (Oberhessen) eingeschult. Ab 1953 besuchte ich das Gymnasium in Frankfurt/M. (Muster-Schule). Am 24. Februar 1964 legte ich an der Dr. Richter Schule in Kelkheim im Taunus die Reifeprüfung ab.

Im April 1964 begann ich in Gießen an der Justus-Liebig-Universität Veterinärmedizin zu studieren, wo ich am 22. Mai 1967 die Tierärztliche Vorprüfung bestand. Nach Vollendung des 9. Fachsemesters arbeitete ich bei Herrn Dr. A.H. Schmitt in Nürnberg als Veterinärpraktikant. Im Juli 1970 bestand ich die Tierärztliche Prüfung. Am 10. Juli 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Vom 13.7.1970 bis 16.7.1971 war ich bei Herrn Dr. F. Botz in Königsbach/Baden als Assistent beschäftigt. Seit Juni 1972 bin ich am Staatl. Tierärztlichen Untersuchungsamt Heidelberg im Rindergesundheitsdienst tätig.



